



# Réponse transcriptomique et cellulaire de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens*, cultivé en éclosérie industrielle face aux stress métalliques et aux pathogènes : rôle des probiotiques dans la survie des organismes

Fernando Silva Aciaries

## ► To cite this version:

Fernando Silva Aciaries. Réponse transcriptomique et cellulaire de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens*, cultivé en éclosérie industrielle face aux stress métalliques et aux pathogènes : rôle des probiotiques dans la survie des organismes. Zoologie des invertébrés. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0058 . tel-01089606

**HAL Id: tel-01089606**

**<https://theses.hal.science/tel-01089606>**

Submitted on 2 Dec 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Océanographie biologique*

École Doctorale École Doctorale des Sciences de La Mer

présentée par

**Fernando Silva Aciares**

Préparée à L'institut Universitaire Européen  
de la Mer, Laboratoire des Sciences de  
l'Environnement Marin (LEMAR)

**Réponse transcriptomique et  
cellulaire de l'ormeau rouge *Haliotis  
rufescens*, cultivé en éclosion  
industrielle face aux stress  
métalliques et aux pathogènes. Rôle  
des probiotiques dans la survie des  
organismes.**

**Thèse soutenue le 22 mars 2013**

Devant le jury composé de :

**Nathalie Cochenne**

Dr. HDR Cadre de recherche, IFREMER/ La Trinité Sur Mer/ Rapporteur

**Jean Marc Lebel**

Professeur, Université de Caen Basse Normandie/ Rapporteur

**Michel Auffret**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale/ Examineur

**Arnaud Tanguy**

Dr. MCF, Université de Paris 6 / Examineur

**Carlos Riquelme**

Dr. Université d'Antofagasta (Chili)/ Co-directeur

**Dario Moraga**

Dr. MCF HDR, Université de Bretagne Occidentale/ Directeur

# THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université  
de Bretagne Occidentale  
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer  
Océanographie Biologique  
Institut Universitaire Européen de la Mer

**Fernando Silva Aciares**

Réponse transcriptomique et cellulaire de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens*, cultivé en éclosérie industrielle face aux stress métalliques et aux pathogènes. Rôle des probiotiques dans la survie des organismes.

## ***Remerciements***

C'est avec le plus vif enthousiasme et le plus sincère que je voudrais remercier tous ceux qui à leur manière m'ont aidé à mener à bien cette thèse.

Tout d'abord Je remercie grandement le Dr. Dario Moraga pour avoir assuré la direction de cette thèse. Merci pour la rigueur, le soutien, les conseils précieux, la disponibilité et en particulier pour son amitié. Merci de m'avoir fait confiance au cours de ces années de thèse. Je le remercie aussi pour tous les moments agréables passés à profiter des bons produits de la mer Bretonne.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Carlos Riquelme, mon co-directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de présenter ces travaux dans le cadre d'une thèse d'Université.

J'adresse un remerciement spécial au Dr. Michel Auffret pour son aide précieuse en immunologie, pour ses conseils et sa sympathie.

Merci au Dr. Arnaud Tanguy pour ses conseils, sa disponibilité permanente et sa grande rigueur dans le domaine de la biologie moléculaire.

Merci à mon cher ami Manuel Zapata « Zapatín » pour son amitié, ses conseils, sa disponibilité et l'aide qu'il a su m'apporter dans les manip au cours de cette thèse.

Je tiens à remercier à Jean Luc et Véronique Queau pour leur amitié et leur accueil.

Je tiens à remercier Sleiman Bassin pour son aide dans les manip et les bonnes remarques.

Merci également à Camille Lacroix et Alain Marhic pour leur aide précieuse.

Je tiens à remercier chaleureusement Brigitte Moraga (Pôle langues de l'Université de Bretagne Occidentale) pour la révision finale de ce manuscrit.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail. Mes remerciements s'adressent particulièrement à ma famille, pour son appui, sa confiance et son amour qui m'ont été si précieux durant toute ma vie.



# SOMMAIRE

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
1. Stress environnemental: Implications des métaux traces et des pathogènes.....	2
2. Contexte de l'étude et objectifs.....	6
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Présentation générale du modèle biologique.....</b>	<b>10</b>
1.1. Morphologie.....	11
1.2. Reproduction et développement.....	14
1.3. Alimentation.....	15
1.4. Habitat.....	16
1.5. Importance en aquaculture.....	16
1.6. Cycle de culture et zootechnie.....	18
<b>2. Généralités sur le multi stress dans la culture de l'ormeau: Cas particulier du cuivre..</b>	<b>21</b>
2.1. L'impact du cuivre sur les mollusques marins.....	24
<b>3. Généralités sur le multi stress dans la culture de l'ormeau: Cas particulier des micro-organismes pathogènes (<i>Vibrionaceae</i>).....</b>	<b>28</b>
3.1. Les vibrions pathogènes.....	32
3.1.1. Chez les mollusques.....	32
3.1.1.1. Impact des pathogènes chez l'ormeau.....	34
3.1.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	38
3.1.2.1. Généralités.....	38
3.1.2.2. Habitat et cycle de vie.....	41
3.1.2.3. Les gènes de virulence et les régulateurs.....	42
3.1.2.4. Contrôle du quorum sensing (QS).....	44
3.1.2.5. Effet de <i>V. parahaemolyticus</i> chez l'ormeau.....	46

<b>4. Rôle des probiotiques dans les activités aquacoles. Généralités.....</b>	<b>48</b>
4.1. Définition des micro-organismes probiotiques.....	48
4.2. Utilisation des micro-organismes probiotiques pour la prévention des maladies..	50
4.2.1. Application des probiotiques chez l'ormeau <i>H. rufescens</i> .....	53
4.3. Critères de sélection.....	53
4.4. Voies d'incorporation.....	54
4.5. Possible mode d'action.....	54
4.5.1. Production de composés antibactériens.....	55
4.5.2. Compétition pour les nutriments et sites de fixation chez l'hôte.....	57
4.5.3. Quorum quenching.....	58
4.5.4. Stimulation du système immunitaire.....	60
4.5.5. Amélioration de la qualité de l'eau.....	60
<b>5. Généralités sur les mécanismes immunitaires des mollusques marins.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Généralités sur l'expression génique chez l'ormeau <i>H. rufescens</i>.....</b>	<b>69</b>

## **CHAPITRE I : Effet des probiotiques sur la survie et la croissance chez les juvéniles de l'ormeau rouge *H. rufescens* cultivés en écloserie industrielle.....**

Contexte de l'étude.....	71
<b>Article N°1: Silva-Aciaries, F., Mejías, C., Carvajal, P., Riquelme, C., 2011<sub>a</sub>. Use of macroalgae supplemented with probiotics in the <i>Haliotis rufescens</i> culture in the northern Chile. <i>Aquaculture Research</i> 42 : 953-961.....</b>	<b>75</b>
Conclusion sur le rôle des probiotiques.....	84

## **CHAPITRE II : Caractérisation de la réponse moléculaire et cellulaire chez les juvéniles de *Haliotis rufescens* face au cuivre en conditions expérimentales.....**

Contexte de l'étude.....	88
<b>A. Identification des gènes exprimés chez les Ormeaux juvéniles d'<i>Haliotis rufescens</i> en réponse à différentes concentrations de cuivre en conditions contrôlées.....</b>	<b>92</b>
Généralités.....	93

• Article N°2: <b>Silva-Aciares, F.</b> , Zapata, M., Tournois, J., Moraga, D., Riquelme, C., <b>2011<sub>b</sub></b> . Identification of genes expressed in juvenile <i>Haliotis rufescens</i> in response to different copper concentrations in the north of Chile under controlled conditions. <b>Marine Pollution Bulletin 62: 2671-2680</b> .....	94
• Conclusion sur le chapitre II A.....	104
<b>B. Effets du cuivre sur les activités d'immunomodulation hémodocytaire d'<i>Haliotis rufescens</i></b> .....	105
• Généralités.....	106
• Article N°3: <b>Silva-Aciares, F.</b> , Moraga, D., Riquelme, C., <b>2013</b> . Effect of copper on the immunomodulatory activities of hemocytes in juvenile abalone, <i>Haliotis rufescens</i> cultivate in hatchery conditions. Soumis à <b>Aquaculture</b> .....	108
• Conclusion sur le chapitre II B.....	129
<b>CHAPITRE III : Réponse génomique et cellulaire de <i>H. rufescens</i> nourris avec des probiotiques et cultivé en éclosion industrielle face aux stress des micro-organismes pathogènes</b> .....	131
• Contexte et introduction.....	132
• Article N°4: <b>Silva-Aciares, F.</b> , Moraga D., Auffret, M., Tanguy, A., Riquelme, C., <b>2013</b> . Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (Pathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ) in farmed juvenile <i>Haliotis rufescens</i> fed with or without probiotic diet. <b>Journal of Invertebrate Pathology 113:163-176</b> .....	137
• Conclusion.....	155
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE</b> .....	158
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	170
<b>ANNEXE</b> .....	197

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

<b>Tableau 1.</b> Espèces d'ormeaux cultivées dans le monde.....	17
<b>Tableau 2.</b> Effets du cuivre sur la physiologie des organismes aquatiques.....	23
<b>Tableau 3.</b> Vibrions associés à des maladies et aux mortalités d'ormeaux.....	37
<b>Tableau 4.</b> Infections expérimentales d'animaux d'élevage avec <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	39
<b>Tableau 5.</b> Microorganismes probiotiques utilisés dans la culture des mollusques.....	52
<b>Figure 1.</b> Effet des principaux polluants sur la physiologie des organismes marins.....	3
<b>Figure 2.</b> Vue externe dorsale, ventrale et faciale.....	12
<b>Figure 3.</b> Vue dorsale et ventrale des principaux organes.....	13
<b>Figure 4.</b> Cycle de vie.....	15
<b>Figure 5.</b> Localisation des centres de production nationale de l'ormeau ( <i>Haliotis rufescens</i> ) dans les différentes régions du Chili.....	18
<b>Figure 6.</b> Cycle d'élevage et zootechnie.....	20
<b>Figure 7.</b> Modèle conceptuel d'intégration des événements cellulaires, physiologiques et des signalisations pendant l'exposition au cuivre à court terme et à long terme.....	27
<b>Figure 8.</b> Phylogénie des <i>vibrions</i> .....	30
<b>Figure 9.</b> Cas des maladies provoqués par <i>Vibrio parahaemolyticus</i> observés au Chili entre 1998-2011.....	40
<b>Figure 10.</b> Mécanismes d'action exercés par des bactéries probiotiques.....	55
<b>Figure 11.</b> Schéma récapitulatif sur les mécanismes de la phagocytose des cellules hématocytaires de mollusque.....	62
<b>Figure 12.</b> Schéma sur les mécanismes moléculaires intracellulaires et extracellulaires explicatif de la flambée oxydative chez les hématocytes de mollusques.....	66
<b>Figure 13.</b> Localisation des éclosures : A « Cultivos Marinos San Cristobal à Caldera », Chili. ; B. « Cultivos LiveSeafood à Coquimbo », Chili.....	71
<b>Figure 14.</b> Activité exo-enzymatique et d'inhibition des bactéries probiotiques.....	72
<b>Figure 15.</b> Schéma récapitulatif des différentes étapes expérimentales (chapitre I).....	73
<b>Figure 16.</b> Schéma résumant la démarche technique (chapitre II).....	91
<b>Figure 17.</b> Schéma représentant l'infection bactérienne expérimentale chez <i>H. rufescens</i> .....	134
<b>Figure 18.</b> Schéma résumant la démarche technique (chapitre III).....	136
<b>Figure 19.</b> Schéma simplifié des interactions entre l'ormeau <i>H. rufescens</i> , sa microflore bactérienne intestinale et les probiotiques.....	161

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

AHL	Acyl-Homo Sérine Lactone
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFLP	Amplified Fragment Lenght Polymorphism
AI <sub>s</sub>	AutoInducteurs
AMP <sub>c</sub>	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN	Acide RiboNucléique
ARN <sub>r</sub>	ARN ribosomique
ARN <sub>t</sub>	ARN de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
CytoxI	Cytochrome Oxydase I
CytoxIII	Cytochrome Oxydase III
CPs	Composés extracellulaires
Ct	threshold Cycle
DD	Differential Display
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DL50	Doses Létales 50
EF1 $\alpha$	Elongation factor 1 $\alpha$
EST	Expressed Sequence Tag
ETM	Éléments Traces Métalliques
FAO	Food and Agriculture Organization
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FTM	Fluid Thioglycollate Medium
FREPs	Fibrinogen Related Proteins
GFP	Green Fluorescent Protein
GPx	Gluthatione peroxidase
GST	Glutathione S-Transferase
GSH	Glutathion réduit
HAPs	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCT	Hémocytes Circulants Totaux
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Péroxyde d'Hydrogène
HOCl	Hypochlorite
HSP40	Heat Shock Protein 40

LPr1	Lipoprotein Receptor Related Protein
LPS	LipoPolySaccharide
MEP	Macrophage Expressed Protein
MAP Kinase	Mitogen activated Kinase
MLST	Multilocus Sequence Typing
MPO	MyéloPéroxydase
MPSS	Massively Parallel Signature Sequencing
MTs	Métallothionéines
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADH4	NADH dehydrogénasse sub unité 4
NK	Natural Killer
NO	Oxyde Nitrique
NO-	Radicaux d'oxyde nitrique
NOS	NO Synthase
OH <sup>-</sup>	Anion hydroxyle
O <sub>2</sub>	Oxygène moléculaire
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Radical singulet de l'oxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion radical superoxyde
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrite
OP	Opaque
ORF	Open Reading Frame
PAMPs	Pathogen-Associated molecular Patterns
pb	Paire de base
PCB	Polychlorobiphényles
PCR	Polymerase Chain Reaction
PK	Phénomène de Kanagawa
PKA	Protéine kinase A
PO	PhenolOxydase
PRRs	Patterns Recognition Receptors
PRP	Pathogen Recognition Pattern
QQ	Quarum Quenching
QS	Quorum Sensing
RACE	Amplification rapide d'extrémités de ADNc
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA <sub>m</sub>	RNA messenger
ROO-	Radicaux hydroxyle
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
RT	Reverse Transcription
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SAGE	Serial Analysis Gene Expression
SOD	Superoxyde dismutase
SSC	Size SCatter height
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
SST I à VI	Système de Sécrétion de Type 1 à 6
TBT	TriButylTin
TCBS	Thiosulfate-Citrate-Bile salt-Sucrose agar
TDH	Thermostable Direct Haemolysin
TLH	Thermolabile hemolysin
TR	Transparent
TRH	TDH-Related Hemolysin
UFC	Unité Formant Colonie
Vdg3	Veliger digestive gland gene
Vp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Vm2	Veliger mantle gene
WS	Withering Syndrome

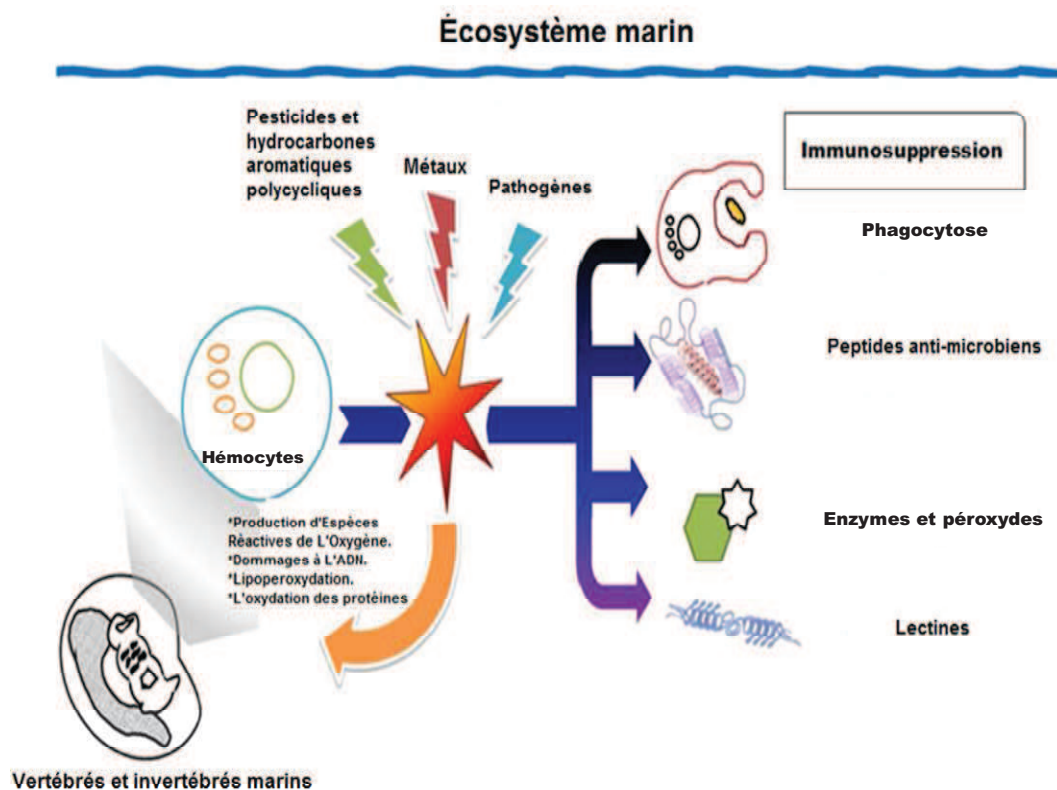


# INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1. Stress environnemental : Implications des métaux traces et des micro-organismes pathogènes

Dans les écosystèmes marins, l'activité anthropique, mais aussi les paramètres naturels induisent chez les organismes aquatiques des situations de «multistress». Les principales perturbations anthropiques affectant les zones côtières sont la surexploitation des ressources naturelles comme la pêche et l'aquaculture intensive (Heral, 1993), la dégradation et la fragmentation de l'habitat écologique (Komatsu, 1997), et le rejet de nombreux polluants en raison de l'urbanisation, des activités industrielles et agricoles (Tett et al., 2003). Ce dernier point nécessite une attention particulière puisque l'ensemble des contaminants rejetés dans l'environnement, quel que soit le compartiment (air, eau, sol), finit par se retrouver dans les milieux aquatiques, en particulier dans les écosystèmes estuariens, par le biais des eaux de ruissellement et de percolations. De ce fait, ces zones comptent parmi les plus exposées aux différents types de pollution récurrente, comme les matières organiques en excès qui induisent des phénomènes d'eutrophisation, les polychlorobiphényles (PCB), les radionucléides, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les éléments traces métalliques (ETM), mais également les organismes pathogènes (virus, procaryotes, eucaryotes unicellulaires...) qui peuvent augmenter les niveaux physiologiques d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote ( ex. , l'anion radical superoxyde  $O_2^-$ , peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , radicaux hydroxyle  $ROO^-$ , radicaux d'oxyde nitrique  $NO^-$ ) provoquant un stress oxydatif chez les organismes marins (Figure 1) (Galloway & Depledge, 2001; Valavanidis et al., 2006; Zhang et al., 2010). Dans ce contexte, différents marqueurs enzymatiques et protéomiques sont utilisés pour mesurer et évaluer le stress multiple de l'environnement. Les activités des enzymes superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et catalase sont utilisées pour mesurer et évaluer le stress oxydatif dans les tissus des organismes marins (Valavanidis et al., 2006). Les métallothionéines (MTs) sont une famille de protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif, en particulier des métaux traces et toxiques. Ce sont des peptides de faible poids moléculaire, riches en cystéine, qui présentent une activité de capture oxyradical et une forte affinité pour les ions métalliques libres tels que Zn, Cd, Cu, Hg, et

provoque ainsi la séquestration et détoxication des métaux. En réponse au stress oxydatif et l'anoxie, la transcription des MTs se produit généralement par la trans-activation des éléments promoteurs de réponse métallique (Bourdineaud et al., 2006).



**Figure 1.** Effet des principaux polluants sur la physiologie des organismes marins (adapté de Girón Perez., 2010).

Toutefois, ces métaux essentiels peuvent s'avérer toxiques pour diverses formes de vie, à des teneurs plus élevées (ex : cuivre et zinc). Il en est de même pour d'autres métaux dont le caractère indispensable n'est pas démontré (ex: cadmium, mercure et plomb). Les plus connus pour leur dangerosité sont le plomb (Pb), le mercure (Hg) et le cadmium (Cd), suivis par le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le zinc (Zn). Également, les ETM peuvent être fortement mutagènes et cancérigènes et peuvent aussi entraîner à l'échelle de l'organisme, d'importantes perturbations du système nerveux, cardiovasculaire, immunitaire, gastro-intestinal, hépatique, rénal, respiratoire et reproducteur (Cornelis et al., 1993; Wang, 2012). Les atteintes structurales et fonctionnelles

engendrées par les métaux sur la composante biologique des écosystèmes aquatiques se répercutent sur les différents niveaux d'intégration, à l'échelle des individus, des populations, des communautés et des écosystèmes. Dès lors, la prédiction de l'impact environnemental de ces substances toxiques à des niveaux sub-létaux est un des challenges majeurs pour la recherche en écotoxicogénomique environnementale. Les effets des polluants à des niveaux d'intégration élevés (population et écosystème) étant toujours précédés de changements précoces à l'échelle individuelle, il est apparu indispensable de développer des biomarqueurs d'alerte précoce d'effets toxiques (Van der Oost et al., 2003). Ces biomarqueurs ont l'avantage par leur sensibilité, de réduire la durée des expérimentations et de la reproductibilité. Ils vont en effet permettre d'évaluer le degré des dommages engendrés par des polluants sur les organismes, à l'échelle moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique (Plaxton, 2004; Sarkar et al., 2006; Alves et al., 2007; Currie, 2012). Dans le cadre de cette thèse, les différentes recherches ont été réalisées dans le Pacifique Nord du Chili, région reconnue principalement pour son activité minière (exploitation de cuivre), qui coexiste avec le développement de l'aquaculture de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens*. Ces recherches sont d'un grand intérêt pour comprendre l'effet de la contamination par le cuivre sur la physiologie des ormeaux juvéniles et plus particulièrement pendant la phase critique de leur développement ontogénique. Cette période critique des juvéniles s'est traduite par des mortalités aussi bien en milieu naturel qu'en milieu contrôlé, d'où la nécessité d'avoir des informations sur l'effet de cet élément associé à d'autres facteurs sur la survie et l'adaptation des organismes en conditions changeantes.

Ces bactéries pathogènes, font l'objet d'une attention particulière dans notre problématique puisqu'ils constituent l'une des principales menaces sur les populations de mollusques souvent citées comme un facteur limitant la production de mollusques exploités ou non (Paillard et al., 2004<sub>a</sub>; Leyton & Riquelme, 2008; Beaz-Hidalgo et al., 2010; Ruwandeepika et al., 2012). Pour faire face à l'agression de ces pathogènes, les mollusques disposent d'un système immunitaire « inné » qui contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme hôte en éliminant les composants étrangers

(particules du non soi, bactéries, virus, parasites...). Ce système repose sur des cellules, appelées hémocytes, capables de se développer et de se différencier sous le contrôle de facteurs humoraux, et pouvant montrer différentes activités, notamment la phagocytose ainsi que la production et la libération de molécules actives amenant à la destruction de corps étrangers (Hooper et al., 2007; Gestal et al., 2008; Donaghy et al., 2010; Coyne, 2011). Il est intimement relié aux systèmes nerveux et endocrinien, avec lesquels il communique par l'intermédiaire de médiateurs solubles (Krzystyniak et al., 1995). Pour ces raisons, ils sont extrêmement vulnérables dans un contexte de pollution croissante. Selon Sniezko (1974), le déclenchement d'une maladie chez un organisme résulte de l'interaction entre l'hôte, l'organisme pathogène et l'environnement. Par conséquent, il est essentiel d'étudier les interactions des contaminants d'origine anthropique et bactérienne et leurs effets sur l'apparition des maladies dans un contexte environnemental. De nombreux travaux ont révélé une nette augmentation de la sensibilité des organismes marins aux infections virales, bactériennes et parasitaires en relation avec la présence de contaminants et associés à l'augmentation des températures dans les milieux estuariens et côtiers (Coles et al., 1994<sub>a</sub>; 1995; Pipe & Coles, 1995; Pipe et al., 1999; Morley, 2006; 2010). Dans le cadre de cette étude, l'effet du stress bactérien, en particulier par le pathogène *Vibrio parahaemolyticus* sur la physiologie et la survie de *H. rufescens* nourris avec et sans probiotique a été étudié. Ce type d'étude n'a pas été documenté à ce jour chez l'orveau rouge. L'étude trancriptomique et cellulaire chez cet organisme est indispensable pour établir les caractéristiques de résistance et de sensibilité des animaux face à l'impact des bactéries pathogènes dans les écosystèmes potentiellement impactés par *V. parahaemolyticus*. Il faut rappeler que la culture de l'orveau rouge *H. rufescens* au Chili a lieu dans des zones maritimes qui ont présenté naturellement des périodes de fortes concentrations de bactéries pathogènes, d'où l'importance de faire des études au niveau moléculaire et physiologiques chez les orveaux pour comprendre l'impact de ce facteur sur la survie, le développement, la croissance et le maintien des animaux en éclosion industrielle.

## 2. Contexte de l'étude et objectifs

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux études sur les réponses moléculaires et physiologiques de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens*, en particulier, sur les interactions existantes entre l'impact métallique, organismes pathogènes et en présence d'organismes probiotiques pendant le stade juvénile de ce mollusque

L'aspect principal de ce travail se focalise sur l'impact du cuivre et du pathogène *Vibrio parahaemolyticus* à l'origine des mortalités d'*Haliotis rufescens* au stade juvénile.

Trois axes de recherches principaux sont pris en compte dans cette étude:

- 1) Effet des probiotiques sur la survie et la croissance de *H. rufescens*, en particulier à partir de la période critique de jeunes individus où des mortalités importantes sont observées lorsque ces gastéropodes changent de modalités trophiques, passage de l'alimentation de microalgues à macroalgues.
- 2) Réponse transcriptomique et cellulaire des juvéniles de *H. rufescens* aux stress métalliques (cuivre) en milieu contrôlé pendant la phase physiologique critique en conditions tropiques naturelles.
- 3) Evaluation de l'impact des bactéries pathogènes à l'origine des mortalités différentielles pendant la phase physiologique critique sous alimentation avec ou sans probiotiques.

L'approche scientifique de cette thèse repose sur l'étude en conditions contrôlées dans les écloséries industrielles et au laboratoire. La complémentarité de ces approches permettra une vision plus intégrative sur la stratégie adaptative des organismes en présence de stress multiples de l'environnement marin du nord du Chili zones potentielles pour la culture *in situ* d'*Haliotis rufescens*.

Ce manuscrit s'organise en trois grandes parties : une introduction contenant des rappels bibliographiques sur (1) l'ormeau rouge *Haliotis rufescens*, (2) l'effet du cuivre chez les organismes marins, (3) l'effet des micro-organismes pathogènes chez les organismes marins, (4) rôle des probiotiques dans les activités aquacoles, (5) ; mécanismes immunitaires des mollusques marins et (6) généralités sur l'expression génique chez *H. rufescens* ; une partie résultats regroupant trois grands chapitres contenant les différents articles scientifiques issus de nos recherches ; et une dernière partie consacrée aux conclusions générales des résultats obtenus dans cette étude ainsi qu'aux perspectives de recherche qui se dégagent de ce travail. Les chapitres de résultats sont organisés de la manière suivante :

Le **chapitre I**, est consacré aux approches techniques et conceptuelles sur la fabrication et l'application des probiotiques dans les élevages de ce mollusque. Les paramètres de traits de vie retenus sont : la survie et la croissance de juvéniles de l'ormeau rouge *H. rufescens* sous condition d'alimentation naturelle à base de macroalgues et d'une alimentation normale complémentée par des bactéries probiotiques en milieu contrôlé (écloseries) (Article 1).

Le **chapitre II**, comporte 2 parties: approche transcriptomique et physiologique.

**A.** Cette partie présentera les travaux transcriptomiques réalisés sur ce modèle biologique par une approche transcriptomique visant à explorer les bases moléculaires des réponses adaptatives de cet organisme marin face aux stress métalliques. Ces travaux ont notamment fait appel au développement de banques soustractives pour une exploration génomique et l'expression des gènes associés aux différentes voies métaboliques régulées par différentes concentrations du cuivre sur l'état juvénile de l'ormeau. (Article 2).



**B.** Cette deuxième partie présente les résultats sur l'évaluation de l'impact du cuivre à court terme sur la réponse cellulaire et humorale des hémocytes d'*Haliotis rufescens* en condition d'écloserie industrielle. L'étude repose sur l'analyse quantitative d'hémocytes circulants totaux (HCT), la phagocytose, l'activité phénoloxydase et la production d'anions superoxydes. (Article 3).

Le **chapitre III**, abordera l'impact à court terme au niveau moléculaire et cellulaire de l'infection bactérienne induite par *V. parahaemoliticus* chez les juvéniles (à l'étape du sevrage), en conditions trophiques avec ou sans probiotiques (**Article 4**). Pendant cette étape expérimentale nous avons testé et validé des séquences géniques obtenues par banques soustractives et gènes candidats issus de la littérature de gastéropodes. En plus, nous avons analysé aussi des paramètres hématocytaires par cytométrie en flux.

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## 1. Présentation générale du modèle biologique

*Haliotis rufescens* est un mollusque qui est de la classe des gasteropodes. Cette espèce est originaire des côtes de Californie aux États-Unis. Les registres actuels renseignent sur la datation de ce taxon qui est rapporté depuis 100 millions d'années, avec les premiers fossiles d' *H. rufescens* il y a d'environ 70 millions d'années pour les espèces actuelles (Lindberg, 1992).

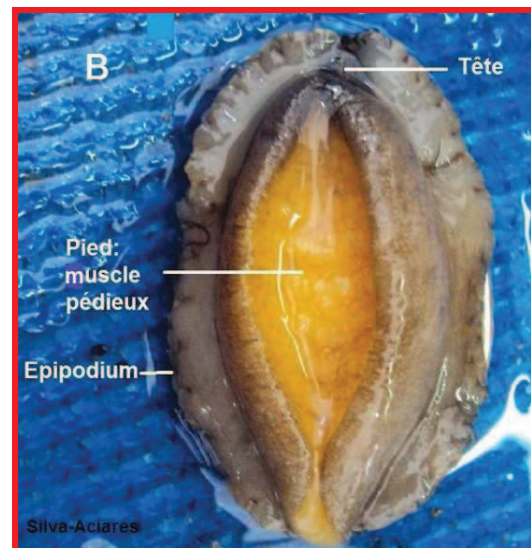
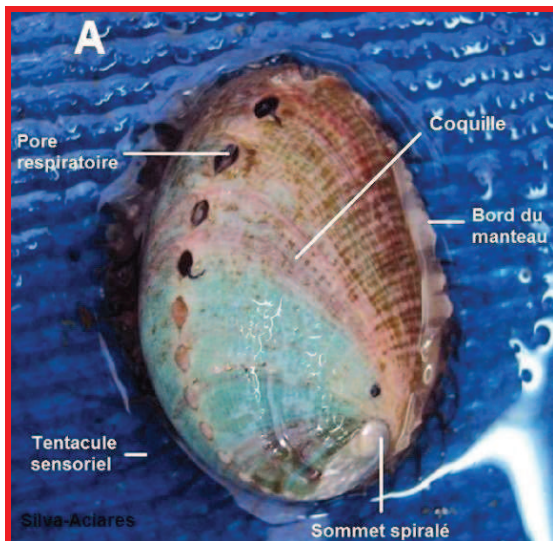
*Biosystématique d'Haliotis rufescens* selon Swainson (1822)

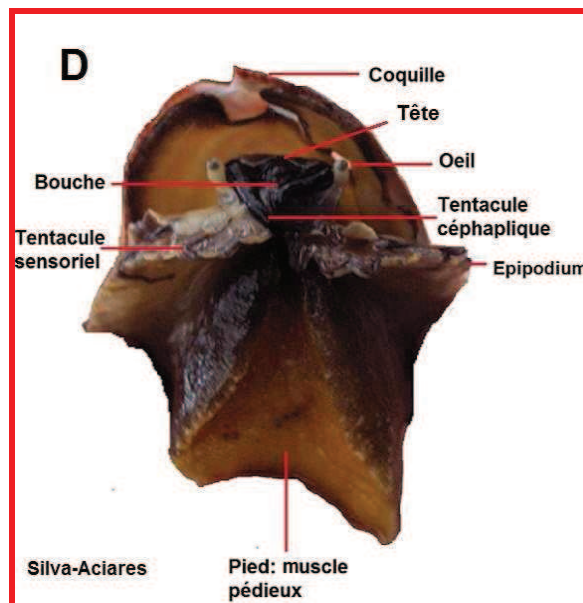
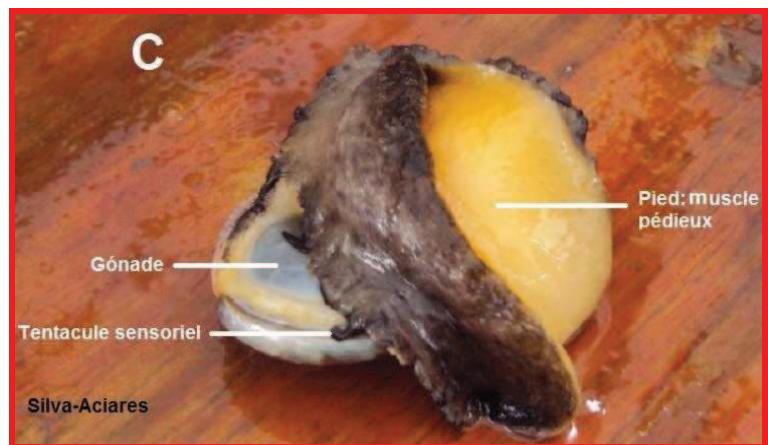
Royaume	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Mollusca</i>
Classe	<i>Gastropoda</i>
Sous-classe	<i>Prosobranchia</i>
Ordre	<i>Archaeogastropoda</i>
Super-famille	<i>Pleurotomariacea</i>
Famille	<i>Haliotidae</i>
Genre	<i>Haliotis</i>
Espèce	<i>Haliotis rufescens</i>

Sur les 80 espèces représentées dans le monde, 17 ont une importance commerciale (Hahn, 1989). Parmi elles, l'ormeau rouge, *H. rufescens*, présente une taille maximale de 31.3 cm et d'un poids de 2 kg (Leighton, 2000). Les caractéristiques d'adaptabilité et de développement particulières font de cette espèce un modèle de choix dans les activités aquacoles de nombreux pays à travers le monde comme : Le Chili, les États-Unis et le Mexique (Flores-Aguilar et al., 2007). *H. rufescens* est distribuée géographiquement depuis Sunset Bay, Oregon (Etats-Unis) à Bahia Tortugas, Baja California Sur (Mexique), ce qui correspond à un tiers de sa distribution mondiale.

### 1.1. Morphologie.

La morphologie générale de l'ormeau est présentée sur les figures 2 et 3. La coquille est épaisse, ovale aplati, unguiforme. Le sommet est proche du bord. La surface extérieure est rugueuse avec des anneaux de croissance concentrique. La coquille présente, trois ou quatre trous ou pores respiratoires ouverts, caractéristiques de ces gastéropodes. En général, la couleur est blanche avec des bandes rouges et une bordure rouge, étroite, autour de la coquille. L'intérieur quant à lui est rose, bleu ou vert avec une grande impression du muscle central. Le bord de la coquille est lisse et épais, ondulé par des stries de croissance (Osorio, 2002). Le pied est un muscle robuste de l'ormeau avec une forte puissance d'aspiration lui permettant une fixation solide aux surfaces de son environnement. L'enveloppe entourant le pied « l'epipodium », est une structure sensorielle qui présente différentes tailles de tentacules sensoriels lui permettant de détecter les prédateurs et la ressource trophique ; en outre, cette structure est un indice d'identification des espèces d'ormeaux.





**Figure 2.** *H. rufescens* - vues externe dorsale, ventrale et faciale. Vue dorsale (A), vue ventrale (B et C) et vue faciale (D et E). Les principaux organes visibles sont légendés.



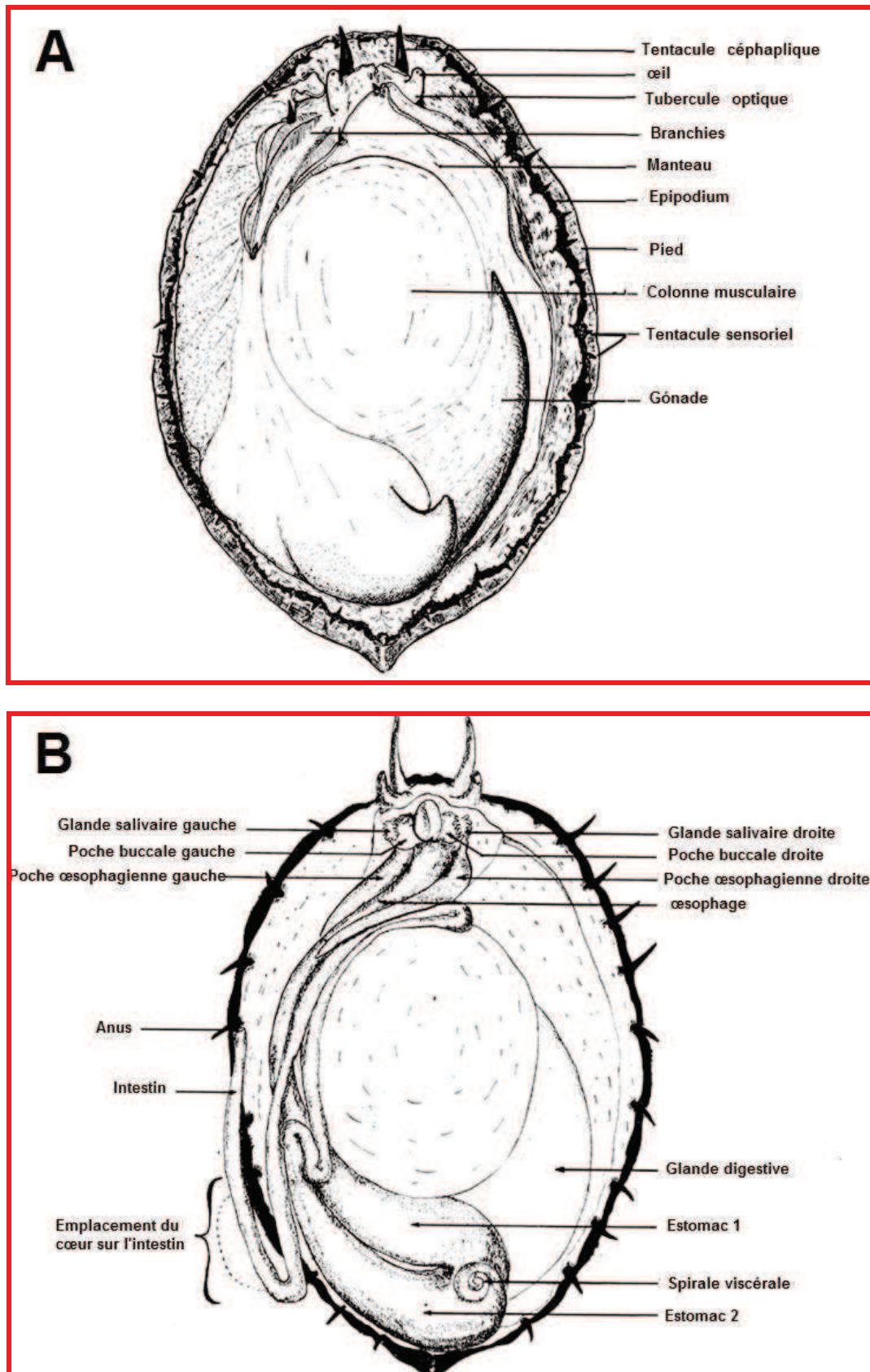


Figure 3. *H. rufescens* - vue dorsale (A) et ventrale (B) (adapté de Cox, 1962).

### 1.2. Reproduction et développement

Le cycle reproductif de l'ormeau (Figure 4) débute par la libération des gamètes dans la mer, car ils sont gonochoriques avec une fécondation externe. La période de reproduction est annuelle et dépend du degré de maturité des gonades et de la température et de la disponibilité trophique du milieu. Les ovules et les spermatozoïdes sont libérés dans le milieu marin à travers des pores de respiration de la coquille. Ceci est connu sous le nom de frai par diffusion. Les ormeaux d'une taille de 3.8 cm peuvent pondre plus de 10.000 œufs et les ormeaux de 20.32 cm plus de 11 millions en une fois. La ponte peut être contrôlée par la température de l'eau ou par la photopériode. La présence d'œufs et de sperme dans l'eau peut stimuler d'autres ormeaux et augmenter ainsi les chances de fécondation. De l'œuf éclot une larve microscopique qui est lecitotrophique et fait partie du plancton pour une période allant de 4 à 15 jours jusqu'à sa fixation sur un substrat adéquat. Elle continue son développement jusqu'à sa forme définitive. La probabilité qu'une larve d'ormeau arrive jusqu'à l'âge adulte est très faible. Les algues corallines encroûtantes stimulent la fixation et la métamorphose des organismes avec le développement de l'appareil digestif et le début d'une alimentation externe composée principalement de diatomées benthiques, de bactéries, d'algues filamenteuses et de matière organique (biofilm) qui se trouvent dans le substrat environnant (biofilm) (Hahn, 1989; Leighton, 2000).

Le développement post-larvaire se termine dès l'apparition des premiers pores respiratoires au bout de 50 jours après la fixation, puis les animaux entrent en phase de juvénile et la coquille mesure 2 mm Longueur (Leighton, 2000). Simultanément les préférences alimentaires évoluent par ingestion de particules plus grosses jusqu'à une alimentation à base de macroalgues. Dans la plupart des cas, la couleur des gonades à l'état adulte est différente selon le sexe : verte chez la femelle et jaune chez le mâle (Leighton, 2000). Sur la coquille va se développer une épifaune et des relations interspécifiques sont établies avec d'autres organismes comme les balanes, des bryozoaires, polychètes, micro et macro-algues, entre autres (Hahn, 1989).



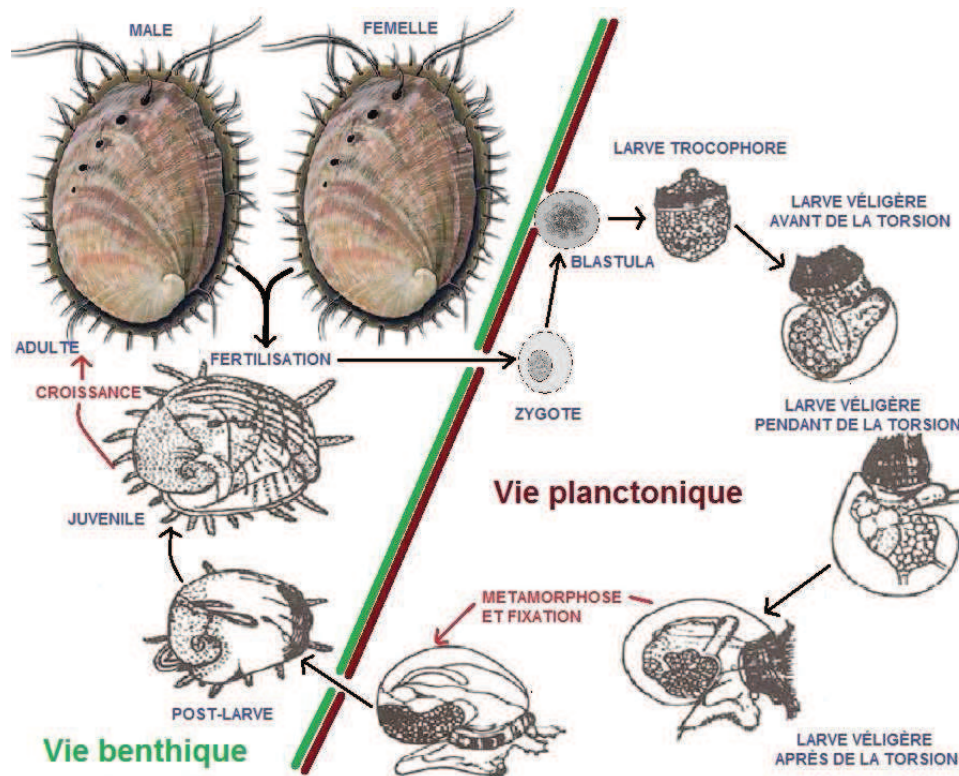


Figure 4. Cycle de vie d'*Haliotis rufescens* (Rhode, 2010 modifié)

### 1.3. Alimentation

L'ormeau se nourrit dans la nuit et l'alimentation est naturellement à base de microalgues et macroalgues. Au stade larvaire les réserves vitellines sont suffisantes pour couvrir leurs besoins énergétiques (Viana, 2002). Pendant la phase pélagique et le début de la phase benthique le régime alimentaire se compose de plancton. L'alimentation des post-larves et juvéniles est à base de microalgues vertes ou rouges et de diatomées benthiques encroûtantes qu'ils broutent avec leur radula. Les juvéniles, quand ils atteignent une taille de 10-18 mm, commencent à consommer des macroalgues de l'ordre de 10 à 30% de leur poids corporel, principalement en raison de la forte teneur en eau et la faible teneur en protéines de macroalgues (Hahn, 1989; Leighton, 2000; Pizarro, 2003). L'ormeau peut survivre pendant de longues périodes de jeûne, en utilisant des protéines de leurs tissus comme source d'énergie pour répondre à leurs besoins énergétiques de base, tandis que les lipides ne

sont pas utilisés ; il a un préferandum pour des bactéries pour être plus efficace pour sa physiologie digestive (Viana, 2002). Ces organismes disposent d'un système digestif efficace pour obtenir les glucides à partir de la dégradation de la cellulose, l'agar, l'alginate, le carragénane et l'amidon à l'aide de bactéries contenues dans leur tractus digestif (Viana, 2002).

### 1.4. Habitat.

*Haliotis rufescens* habite les côtes rocheuses de l'aire supralittorale à 165 m de profondeur, avec une plus grande abondance à 6 et 15 m, où ils existent différentes macroalgues pour l'alimentation des adultes et les microalgues benthiques consommées dans les premiers stades de leur développement. En général on ne le trouve pas dans les zones abritées, ils préfèrent des endroits où il y a un hydrodynamisme important grâce à l'action des vagues et des vents qui provoquent des remontées d'eau profonde, avec un optimum thermique variant de 7 et 16 ° C (Leighton, 2000).

### 1.5. Importance en aquaculture

L'intérêt pour la culture de l'ormeau au niveau mondial a rapidement augmenté, principalement en raison du déclin de la pêche, avec un accroissement des prix du marché mondial. De fait les activités aquacoles sont activement mises en œuvre dans de nombreux pays (Troell et al., 2006, Flores-Aguilar et al, 2007; Roodt-Wilding, 2007) avec une croissance aquacole progressive (Enriquez & Villagran, 2008), ce qui implique, dans les pays concernés des efforts considérables pour soutenir l'industrie aquacole et faire de ces espèces un élément de production d'avenir. L'aquaculture de l'abalone a débuté au Japon il y a 50 ans avec la culture d'*Haliotis discus hannai* afin de reconstituer les gisements locaux et augmenter la production (Ino, 1980). La production internationale de l'ormeau a augmenté de 2.000 tonnes produites en 2000 à plus de 40.000 tonnes en 2008 (FAO,

2010). Les principaux producteurs d'ormeaux sont la Chine, la Corée et Taïwan. Plusieurs autres pays, dont le Chili, l'Australie, le Mexique, la Nouvelle-Zélande, Afrique du Sud, la Thaïlande et les États-Unis ont également développé de manière significative l'aquaculture de différentes espèces d'ormeau (Allsopp et al., 2011) (Tableau 1).

**Tableau 1.** Espèces d'ormeaux cultivées dans le monde

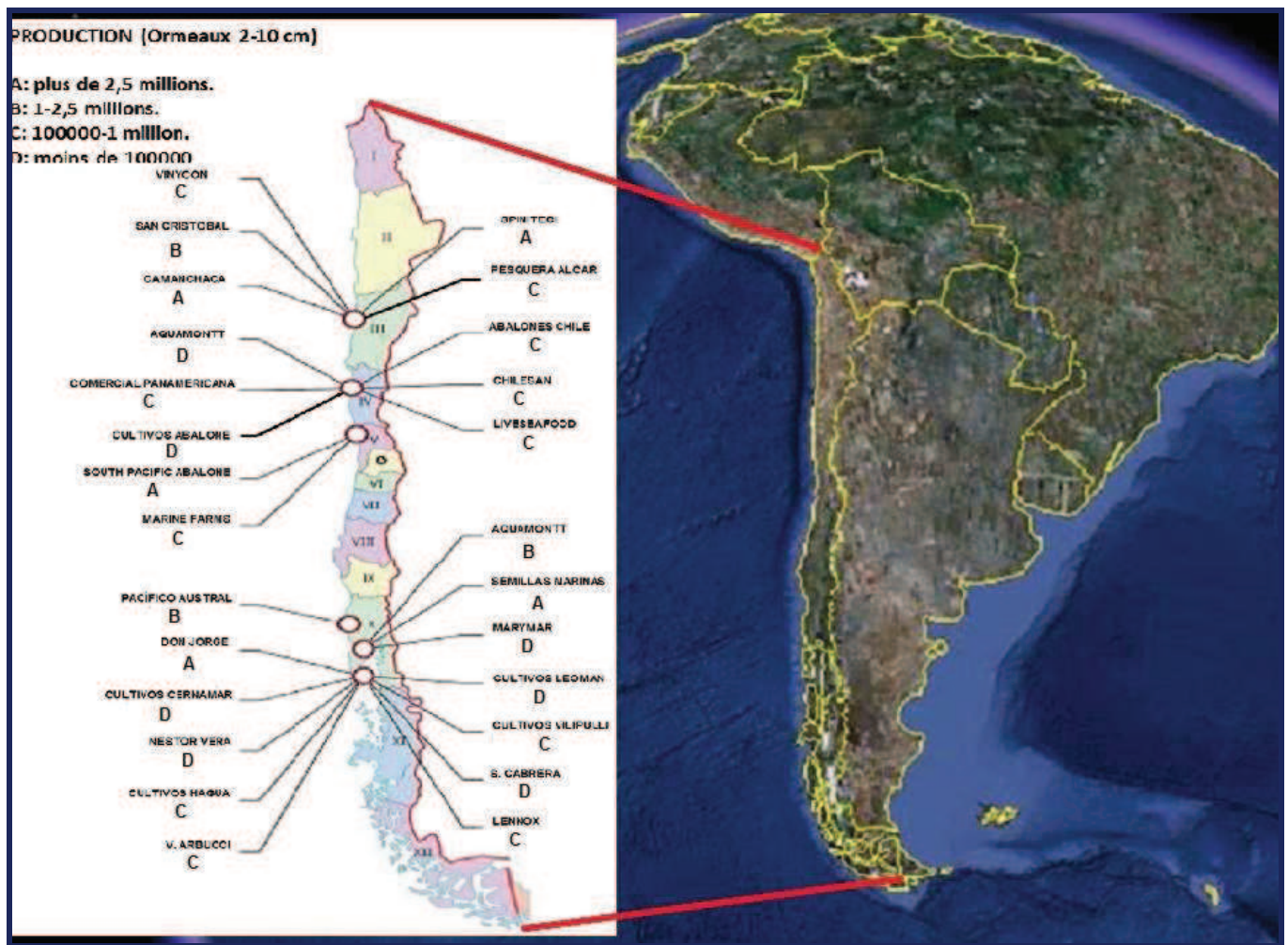
<b>Pays</b>	<b>Espèces communément cultivées</b>	<b>Production 2008 (Tons)*</b>
Chine et Taïwan	<i>Haliotis discus hannai</i>	33.010
Corée	<i>Haliotis discus</i> - <i>Haliotis discus hannai</i> - <i>Haliotis diversicolor</i> - <i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	5.146
Afrique du Sud et Namibie	<i>Haliotis midae</i>	1.040
<b>Chili</b>	<b><i>Haliotis discus hannai</i> - <i>Haliotis rufescens</i></b>	<b>545</b>
Australie	<i>Haliotis laevis</i> - <i>Haliotis rubra</i>	504
Taïwan	<i>Haliotis diversicolor</i>	348
Etats-Unis	<i>Haliotis rufescens</i> – <i>Haliotis fulgens</i> - <i>Haliotis corrugata</i>	175
Mexique	<i>Haliotis rufescens</i> – <i>Haliotis fulgens</i> - <i>Haliotis corrugata</i>	60
Thaïlande	<i>Haliotis asinaria</i>	30
Nouvelle-Zélande	<i>Haliotis iris</i> - <i>Haliotis australis</i>	8
Japon	<i>Haliotis discus hannai</i>	N.A
Canada	<i>Haliotis kamtschatkana</i>	N.A
Irlande	<i>Haliotis tuberculata</i>	N.A

N.A: Données non disponibles

\* Données de production obtenues à partir de la FAO. Fisheries and Aquaculture Informations and Statistics Service Website, 2010.

L'industrie de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens* au Chili est largement soutenue par les instances de l'état et le secteur privé. Il existe actuellement 25 entreprises productrices de cette ressource (Flores-Aguilar., 2007) (Figure 5). La culture de l'ormeau a commencé au Chili en 1977 grâce à l'introduction de naissains de l'ormeau rouge originaires des côtes Californiennes. Dans un

premier temps, des nouvelles technologies de culture expérimentale réalisées principalement dans des réservoirs circulaires de 200 L ont été mises au point pour la maîtrise de la fixation et la métamorphose. Ensuite, des structures rectangulaires sont utilisées pour le pré-grossissement et les cultures marines en cages immergées en mer (Flores-Aguilar et al., 2007).



**Figure 5:** Localisation des centres de production nationale de l'ormeau (*Haliotis rufescens*) dans les différentes régions du Chili (Enríquez & Villagran, 2008 Modifié).

## 1.6. Cycle de culture et zootechnie de l'ormeau en écloséries

Le cycle de culture de l'ormeau commence généralement par le conditionnement des reproducteurs, nourris avec des macroalgues brunes fraîches correspondant à 10 et 15% de poids

corporel par jour (Figure 6). Après la fécondation, l'éclosion a lieu au bout de 10 heures et on obtient ensuite une larve trochophore. Les larves trochophores sont pélagiques pour une période de 3 à 7 jours jusqu'à l'étape de fixation et la métamorphose. La température optimale de l'eau de mer est d'environ 20° C. Les températures inférieures à 17° C et supérieures à 24° C ne sont pas appropriées pour la croissance larvaire. Lorsque la larve atteint le dernier stade larvaire, elle perd sa capacité à nager et devient benthique après avoir développé un pied lui permettant de se déplacer et adhérer à un substrat.

A ce stade, on doit fournir un substrat approprié pour la fixation larvaire, ce qui peut être une plaque de polycarbonate précédemment colonisées par des diatomées benthiques. La densité effective de diatomées benthiques pour assurer la survie et l'alimentation des larves nouvellement fixées ne doit pas être supérieure à 3000 cellules/mm<sup>2</sup>. Les larves peuvent se nourrir avec des organismes d'une taille comprise entre 5-10 microns durant les 10 premiers jours. Après 20 jours, elles se nourrissent avec des diatomées de 20 microns. Dans de nombreux cas, le taux de mortalité larvaire est élevé pendant les 60 premiers jours. Cela est dû à des facteurs tels que la qualité de l'eau, la qualité et la quantité des aliments. Parfois, le taux de mortalité peut augmenter en raison de la prolifération de diatomées benthiques toxiques dans les systèmes d'élevage. La première phase de pré-grossissement appelée «sevrage» correspond au changement de nourriture chez les juvéniles (passage de microalgues à macroalgues). Cette étape dure environ 10 mois avec un taux de survie de 60%. Après cette période d'adaptation aux nouvelles conditions trophiques, les juvéniles ont une taille comprise entre 10-18 mm. Ils sont transférés dans des systèmes de paniers de culture jusqu'à une taille de 25 mm de longueur. Au stade de naissains ils sont transférés dans des systèmes de grossissement correspondant à des bassins sur terre ou directement dans des concessions marines. Pendant la phase de grossissement, l'alimentation des animaux est similaire à celle du pré-grossissement, seules varient la taille des bassins et la qualité de l'eau. Les ormeaux sont maintenus dans ce type d'élevage jusqu'à la taille commerciale de 80 et 90 mm de longueur.



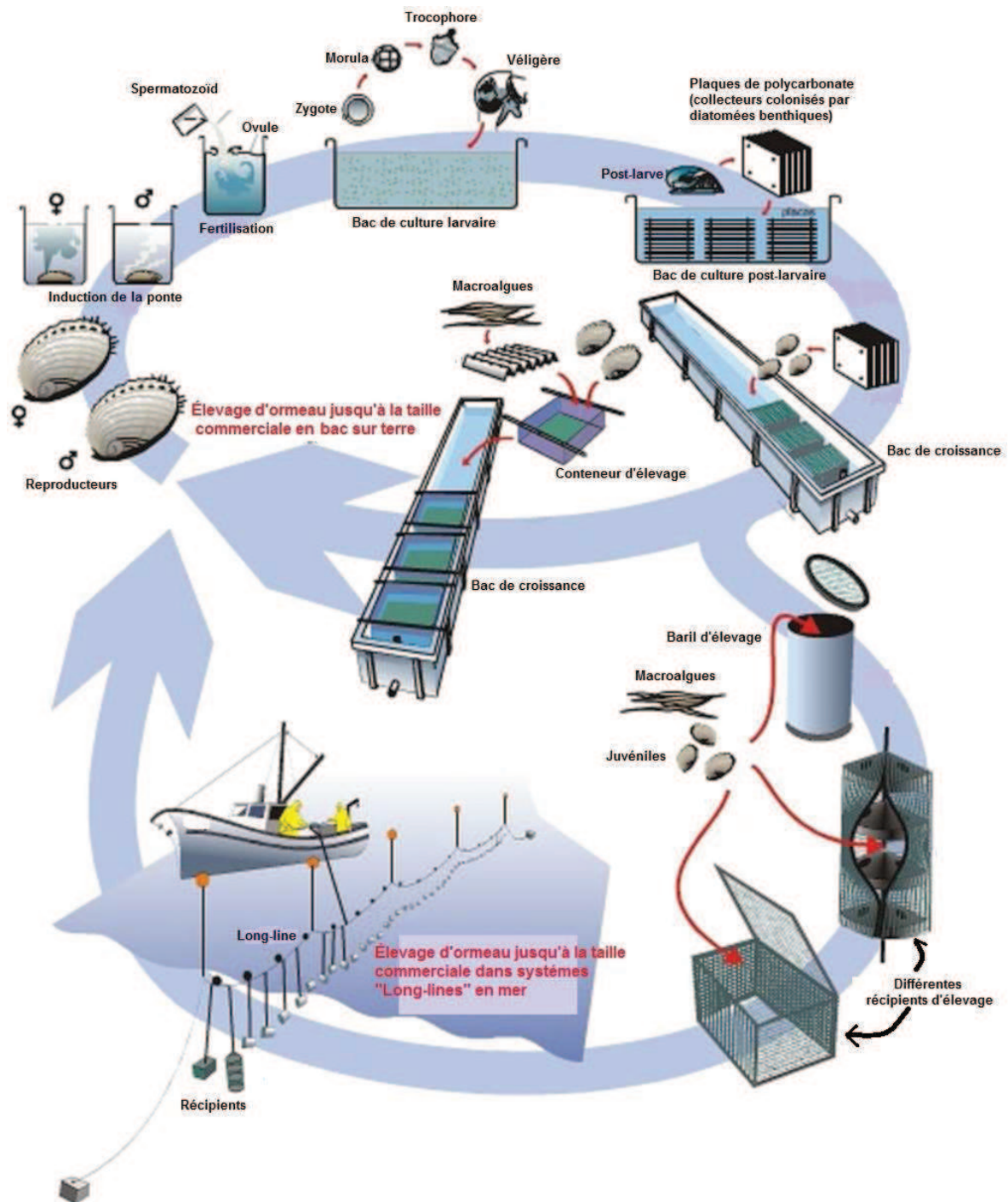


Figure 6. Cycle d'élevage et zootechnie d'*Haliotis rufescens* (Modifié : [www.genetica-abalones.cl/abalonchile.htm](http://www.genetica-abalones.cl/abalonchile.htm))

## **2. Généralités sur le multistress dans la culture de l'ormeau : Cas particulier du cuivre.**

Le développement industriel rapide et notamment l'exploitation minière a entraîné une forte dégradation des écosystèmes marins, affectant les différentes ressources biologiques du milieu côtier et hauturier dont dépendent les communautés humaines des zones côtières. La contamination par le cuivre se produit principalement dans le voisinage des mines d'où il est extrait et traité, et des raffineries pendant la purification de ce métal (Riedel, 2008). Dans le nord du Chili, l'important développement de l'industrie minière (cuivre) a révélé l'existence d'écosystèmes côtiers impactés négativement par la présence de concentrations élevées de métaux et de résidus de ces produits, tels que le port de Chañaral et Taltal (Lee & Correa, 2004; 2005, Ramirez et al., 2005; Stauber et al., 2005; Lee & Correa, 2007), ou dans les ports de chargement et de déchargement de minerais comme le port d'Antofagasta (baie San Jorge) (Riveros et al., 2002, 2003, Salamanca et al., 2004).

Le cuivre est un oligo-élément essentiel nécessaire à la formation de l'hémoglobine, il intervient dans la fonction immunitaire et contre le stress oxydant. Il est présent dans nombre d'enzymes et de protéines (métalloenzymes), telles que l'uréase, la cytochrome oxydase (CO) et la butyle tiroxidas CoA déshydrogénase (White & Rainbow, 1985). Il est impliqué dans des processus métaboliques clés comme le transport des électrons dans la photosynthèse (Raven et al., 1999), la respiration mitochondriale (Salviati et al., 2002), les réponses au stress oxydatif (Won et al., 2012), la signalisation de la transcription (Mori & Schroeder, 2004), l'intégrité de l'ADN (Vosloo et al., 2012), la phosphorylation oxydative, la mobilisation du fer et le fonctionnement de plusieurs systèmes enzymatiques (Salviati et al., 2002; Muñoz et al., 2006; Rubino & Franz, 2012). Toutefois, le cuivre à haute concentration est considéré comme toxique dans l'environnement marin (Piola & Johnston, 2006) car il affecte les fonctions physiologiques et biochimiques de l'organisme, comme la glycolyse (Carvalho & Fernandez, 2008), le cycle de Krebs (Couture & Kumar, 2003), les régulations



osmotiques et ioniques (Pinho et al., 2007), l'équilibre acido-basique, l'excrétion d'ammoniac (Blanchard & Grosell, 2006), la consommation d'oxygène, la croissance (Manyin & Rowe, 2009) et enfin le métabolisme des glucides (Lauer et al., 2012).

La plupart de ces effets peuvent être associés directement ou indirectement à la production d'énergie et au métabolisme insuffisant des organismes pour maintenir l'homéostasie, ce qui peut, dans des conditions extrêmes, provoquer la mort de l'organisme (Lauer et al., 2012). Des concentrations en cuivre supérieures à la normale peuvent réduire les activités phagocytaires et modifier le nombre total d'hémocytes circulant dans l'hémolymph chez la plupart des invertébrés marins (Ellis et al., 2011).

L'homéostasie du cuivre chez les animaux marins implique l'absorption, le transport et l'excrétion régulée de manière similaire aux mammifères (Lushchak, 2011).

Enfin, l'exposition au cuivre dans le milieu marin est une source de stress physiologique et transcriptomique pour les organismes vivant dans les écosystèmes côtiers. Ainsi, plusieurs fonctions essentielles sont perturbées:

- Le maintien des concentrations intracellulaires des éléments vitaux tels que les éléments traces ou les protéines essentielles (homéostasie).
- Les défenses immunitaires contre les agressions des organismes extérieurs (virus, bactéries, parasites).
- Le métabolisme énergétique, la reproduction, la respiration cellulaire, l'expression de gènes et de l'inhibition fonctionnelle des protéines.

Les effets du cuivre sur la physiologie de différentes espèces sont résumés dans le tableau N° 2

**Tableau 2. Effets du cuivre sur la physiologie des organismes aquatiques**

Organisme	Effet sur l'organisme	Référence
<b>Poissons</b>		
<i>Channa punctatus</i>	Induction des protéines antioxydantes ( MTs) dans le foie	Ahmad et al., 2000.
	Effet protecteur du cuivre sur la peroxydation des lipides dans le foie des animaux	Pandey et al., 2001.
	Augmentation de l'activité de la céruloplasmine dans le sérum de l'animal	Parvez et al., 2003.
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Les concentrations de cuivre sublétales diminuent les fonctions olfactives des récepteurs neuronaux.	Baldwin et al., 2003.
	Diminution chimio sensorielle des juvéniles sous variations chimiques de l'eau.	McIntyre et al., 2008.
<i>Onchorynchus mykiss</i>	Augmentation des niveaux sanguins de l'hormone du stress de cortisol, et de MTs dans le foie de l'animal.	Taub et al., 2004.
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Inhibition de glutathion (GSH), augmentation de la catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPx).	Sanchez et al., 2005.
<i>Labeo rohita</i>	Réduction de GSH dans le muscle de l'animal et modulation de la peroxydation lipidique dans le muscle.	Jena et al., 2009
<i>Solea senegalensis</i>	Augmentation de MTs et de la peroxydation lipidique et réduction de la croissance et l'indice de condition biochimique (ARN: ADN) et de la quantité des lipides.	Fonseca et al., 2009.
<i>Carassius auratus gibelio</i> , <i>Cyprinus carpio</i> ,	Augmentation de GSH et de MTs contre le stress oxydatif.	Eyckmans et al., 2011.
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Augmentation de l'activité SOD et de la peroxydation des lipides dans le foie. Diminution de l'activité de la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase et augmentation de MTs dans les branchies.	Garcia Sampaio et al., 2012.
<b>Crustacés</b>		
<i>Palaemon elegans</i>	Mortalité élevée et hyperglycémie chez les animaux.	Lorenzon et al., 2000.
<i>Penaeus monodon</i>	Mortalité élevée, réduction de la croissance et fréquence de mue. Diminution de la capacité d'alimentation.	Chen & Lin, 2001.
	Diminution des hématocytes circulants totaux (HCT) et de l'activité phagocytaire. Augmentation de la flambée respiratoire, de la concentration cytoplasmique de Ca <sup>2+</sup> et une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques	Xian et al., 2010
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Dommage structurel histologique y compris la nécrose des branchies et dans l'hépatopancréas.	Frias-Espéricueta et al., 2008.
<i>Palaemonetes pugio</i>	Diminution de la survie, du taux de respiration et de la croissance somatique.	Manyin & Rowe, 2009.
<i>Panulirus homarus</i>	Diminution du poids musculaire et de l'hépatopancréas. Effets génotoxiques sur les chromosomes. Augmentation du poids dans les branchies.	Maharajan et al., 2011
	Des changements histopathologiques dans le muscle, hépatopancréas, l'intestin, les branchies, le cœur et le ganglion thoracique.	Maharajan et al., 2012
<i>Neohelice granulata</i>	Activité irrégulière des enzymes impliquées dans la glycolyse et le cycle de Krebs dans les branchies. Réduction du potentiel de la membrane mitochondriale.	Lauer et al., 2012.

Tableau 2. *Suite*

Organisme	Effet sur l'organisme	Référence
<b>Microalgues</b>		
<i>Pavlova viridis</i>	Augmentation de la peroxydation lipidique et de l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT, GPx et GSH.	Li et al., 2006
<i>Scenedesmus sp</i>	Inhibition de l'activité de la CAT, ascorbate peroxydase et glutathion réductase. Augmentation de la SOD.	Tripathi et al., 2006
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diminution de la division cellulaire, des défenses antioxydantes et dommage ultrastructurel cellulaire.	Wang & Zheng, 2008.
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>	Diminution de la croissance, de l'activité estérase et de la chlorophylle.	Hadjoudja et al., 2009
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Augmentation de la quantité de protéines et de l'activité de la CAT, SOD et GSH. Diminution de la proportion chlorophylle <i>a</i> / chlorophylle <i>b</i> .	Sabatini et al., 2009
<i>Cylindrotheca closterium</i>	Diminution de l'activité des estérases, de la concentration en chlorophylle <i>a</i> et des taux de croissance.	Araújo et al., 2010.
Picofitoplancton costero ( <i>Synechococcus</i> y <i>Synechocystis</i> ) y oceánico ( <i>Nannochloris</i> ).	Diminution de la densité cellulaire dans les populations océaniques et côtières.	Debelius et al., 2010
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Augmentation de l'activité CAT, dommages de la membrane cellulaire.	Soto et al., 2011
<i>Scenedesmus Quadricauda</i>	Déformations et réduction de la taille cellulaire.	Acharya & Saify, 2012
<i>Planothidium Lanceolatum</i>	Réduction du taux de croissance et du taux de photosynthèse des microalgues.	Sbihi et al., 2012

## 2.1. Impact du cuivre sur les mollusques marins.

L'exposition au cuivre chez les mollusques a été associée à un certain nombre d'événements qui intègrent des mécanismes cellulaires, physiologiques et de signalisation intracellulaire dans différents tissus (Figure 7). Le cuivre est incorporé dans les cycles métaboliques causant des dommages physiologiques et morphologiques (Baqueiro-Cardenas et al., 2007 ; Zhang et al., 2012). L'effet sur le métabolisme des mollusques a été rapporté par Almeida et al., (2003) qui montre que des changements dans les niveaux de 5HT (sérotonine) et de DOPA, ont lieu dans la glande digestive et le tissu musculaire de *Perna perna* exposée au cuivre. La DOPA produit une relaxation du muscle lisse chez *Mytilus edulis* et une contraction du muscle adducteur d'*Anodonta cygnea*. Elle est également un

précurseur dans la formation du périostracum, tandis que la sérotonine induit une relaxation musculaire des moules, et a également un rôle dans la régulation de leur cycle de reproduction (Almeida et al., 2003). De même, Lewis (1990) a signalé que le cuivre produit des changements d'acide lactique dans l'hémolymphe des mollusques comme un indicateur de la réponse au stress. Plus récemment, Zhang et al., (2012) montrent que le cuivre affecte la régulation osmotique et le métabolisme énergétique des mollusques filtreurs.

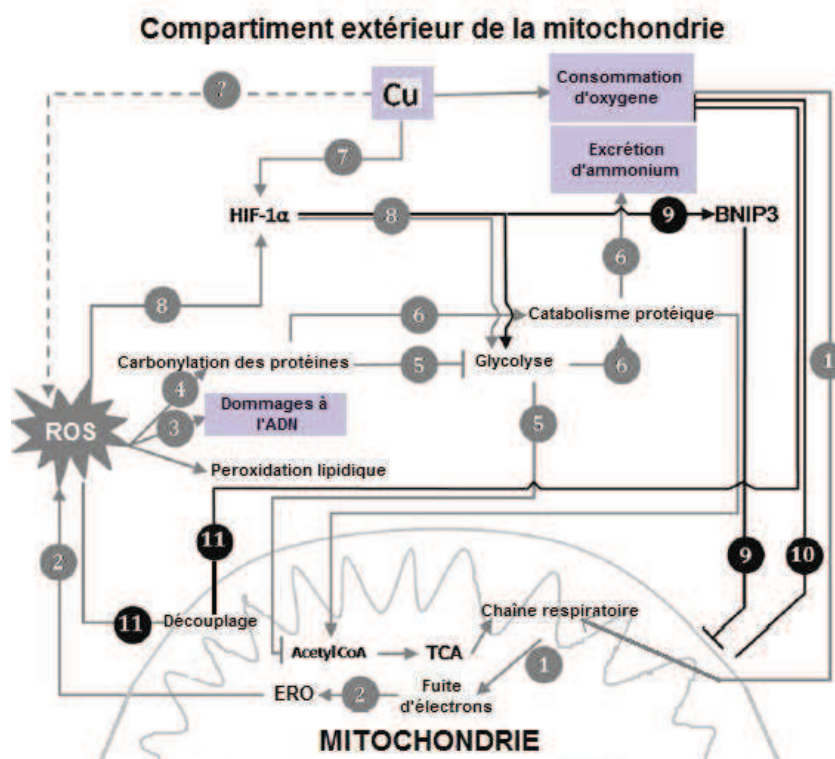
L'augmentation de la tolérance aux ions métalliques par les mollusques est associée à l'affinité pour les métaux des protéines apparentées (Viarengo et al., 1988), modifiant le contenu et la nature des protéines dans les tissus, avec une augmentation de la métallothionéine, agent de liaison avec les métaux (Steinert & Pickwell, 1988). Le mécanisme de capture et d'élimination des polluants métalliques est un processus cellulaire interne mais aussi subcellulaire (Lewis, 1990; Gundacker, 1994), car les organismes peuvent produire et libérer des agents chélateurs qui peuvent réguler la disponibilité locale de cuivre (Lewis, 1990). Les niveaux de tolérance des organismes envers le cuivre varient en fonction du type de polluant, de sa concentration et de la présence d'autres polluants (Baqueiro-Cardenas et al., 2007). La tolérance varie non seulement entre les espèces, mais augmente chez les organismes provenant d'environnements contaminés. Ainsi les populations de *Macoma balthica* issues de milieux contaminés ont montré une plus grande tolérance au cuivre et elles se trouvent en relation directe avec la teneur en métal contenue dans les sédiments de leur site d'origine (Luoma, 1984).

Outre les effets de stress mentionnés précédemment, les polluants ont un certain nombre d'effets négatifs sur les organismes et les populations. Les travaux de Cheng (1988), font état d'une diminution des capacités phagocytaires de *Crassostrea gigas* en présence des bactéries, ce qui réduit leurs capacités de défense, ce point a également été identifié par Matozzo et al., (2001) chez *Tapes philippinarum*. En outre, la présence associée du Cu et Cd est à l'origine d'une détérioration d'une partie lipidique de la membrane cellulaire et du lysosome, provoquant un bouleversant de la diffusion

active (Matozzo et al., 2001). Abel (1976), Almeida et al., (2003) trouvent une relation associée à la réduction de la capacité de filtration par l'effet des métaux chez *Mytilus spp*, qui se traduit par la réduction du potentiel de croissance (Widdows et al., 1996). Fathallah et al., (2010) ont démontré la toxicité du cuivre sur la fécondation et l'embryogenèse des gamètes de la palourde *Ruditapes decussatus*. En outre, Zapata et al., 2009 ont démontré que la fixation des postlarves est affectée par de faibles doses de cuivre (de 2,5 à 10 µg / L) pendant la période de 2 à 8 jours d'exposition aux métaux. Sawasdee et al., (2011) ont montré que le cuivre à des niveaux sublétaux a un effet histopathologique chez le gastéropode *Marisa cornuarietis*. En effet, ce métal peut altérer les cellules épithéliales de la muqueuse de l'épiderme, des cellules digestives et modifier la quantité de mucus dans les branchies. Plus récemment Vosloo et al., (2012) ont signalé que les réponses physiologiques augmentent à la suite de l'exposition à des concentrations sublétales de cuivre sur le bivalve *Perna perna*. En général les réponses physiologiques des organismes dans de telles conditions sont dues à une filtration irrégulière, à un taux élevé de sécrétion du mucus, à des excréctions d'azote et consommation d'oxygène ou encore à une augmentation des ROS conduisant au dommage de l'ADN.

Les travaux sur les effets des métaux traces sur les ormeaux sont limités. Les documents bibliographiques font référence à l'espèce *Haliotis rufescens* et *Haliotis rubra*. L'exposition des embryons de ces deux espèces d'ormeaux au cuivre inhibe le développement normal des larves produisant des anomalies morphologiques dans le développement de l'appareil digestif, du velum et de la coquille, compromettant la survie des larves (Hunt & Anderson, 1993; Conroy et al., 1996; Gorski & Nugegoda, 2006<sub>a</sub>). En outre, l'effet du cuivre a été démontré sur les faibles capacités de métamorphose des larves chez *Haliotis rubra* (Gorski, 2006). Ce métal est associé aux mortalités des juvéniles d'*H. rufescens*, *H. cracherodii* et *H. rubra* (Gorski & Nugegoda, 2006<sub>b</sub>). L'exposition chronique à ce métal a pour conséquence une bioaccumulation significative dans les différents tissus de l'animal. Cet effet du métal chez les ormeaux juvéniles est liée à la production excessive de mucus par les branchies qui affecte le métabolisme respiratoire (hypoxie provoqué par asphyxie) conduisant

à la mort de l'animal (Viant et al, 2002; Gorski & Nugegoda, 2006<sub>b</sub>). D'autre part, il affecte gravement la capacité sensorielle de l'animal, ce qui signifie une perte de rétraction des tentacules et de sa capacité ultérieure à adhérer à un substrat. Il est possible que l'hémolymphe afflux, loin du pied, vers les tentacules et d'autres organes plus dépendants de l'oxygène (Donovan et al., 1999). Cela pourrait affecter la fonction métabolique cellulaire résultant de l'apport d'oxygène insuffisant pour les tentacules et muscle adducteur du pied. Ce manque d'oxygène dans ces tissus entraînerait une incapacité d'adhésion aux surfaces rocheuses (Viant et al., 2002; Gorski & Nugegoda, 2006<sub>b</sub>).



**Figure 7.** Modèle conceptuel pour intégrer des événements cellulaires, physiologiques et de signalisations pendant l'exposition au Cu à court et à long terme. Le cuivre augmente la consommation d'oxygène et la dépense énergétique pour répondre au stress. Cela accélère la chaîne respiratoire (CR) et augmente la probabilité d'une fuite d'électrons (1), ce qui permet une augmentation de ROS « espèces réactives de l'oxygène » (2). Les ROS induisent des dommages de l'ADN (3) et des dommages aux protéines par carbonylation (4). Les enzymes glycolytiques sont préférentiellement carbonylées, permettant l'inhibition de flux glycolytique et la libération d'acétyl-CoA au cycle de Krebs (CK) (5). Le maintien du CK et CR exige que l'acétyl-CoA soit donnée par le catabolisme des protéines, permettant l'augmentation de l'excrétion d'ammonium (6). Le facteur d'induction de l'hypoxie HIF-1 $\alpha$  (responsables de l'induction de la synthèse des enzymes

glycolytiques) est induit par Cu (7) et stabilisé par ROS (8). Dans le court et long terme HIF-1 $\alpha$  serait le signe pour la production et le remplacement des enzymes glycolytiques endommagées. Sur le long terme, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  par l'intermédiaire de la voie de signalisation de BNIP3 (régulateur de l'apoptose en réponse à l'hypoxie), permettrait de réduire la densité mitochondriale (9) ce qui expliquerait la diminution de la consommation d'oxygène. La diminution de la consommation d'oxygène sur le long terme pourrait être maintenue par une augmentation de ROS, permettant le découplage de la respiration mitochondriale par la réduction du gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne (11). Les lignes grises et noires représentent les réponses à court et à long terme, respectivement. La ligne pointillée indique que le cuivre induit directement la production de ROS (Adapté de Vosloo et al., 2012).

### **3. Généralités sur le multistress dans la culture de l'ormeau: Cas particulier des micro-organismes pathogènes (*Vibrionaceae*).**

Les êtres vivants partagent leur environnement avec beaucoup de micro-organismes, en particulier dans le milieu marin où la concentration de bactéries est d'environ 10<sup>6</sup> cellules par millilitre (Leyton & Riquelme, 2008). Ainsi, se produit une variété d'interactions. Certains organismes marins développent des relations symbiotiques qui leur permettent de faire face aux conditions environnementales, cependant d'autres groupes se caractérisent par des infections : dans ce cas, ces organismes établissent une relation dans laquelle l'hôte subit les conséquences physiologiques du pathogène (Leyton & Riquelme, 2008). Les bactéries du genre *Vibrio* font partie de la famille des *Vibrionaceae*, de la classe des  $\gamma$ -proteobactéries. Il existe plus de 119 espèces différentes (<http://bacterio.cict.fr/uw/vibrio.html>; Figure 8), dont au moins 12 espèces sont pathogènes pour l'homme et plusieurs autres organismes infectent les vertébrés et les invertébrés (Heitmann et al., 2005; Drake et al., 2007; Adeleye et al., 2010; Ruwandeepika et al., 2012). Les *Vibrios* sont des bacilles gram-négatifs, de formes souvent incurvées ou droites, mobiles pour la plupart dans les milieux liquides grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Elles peuvent présenter de nombreux flagelles latéraux après culture sur milieu gélosé. Néanmoins certaines espèces sont dépourvues de

flagelles et ne sont pas mobiles. Ce sont des bactéries mésophiles, chimio-organotrophes et anaérobiques facultatives qui sont capables de pousser sur des milieux gélosés adaptés pour des bactéries marines telles que le milieu « Marine agar ». (Thompson et al., 2004). D'autre part, il y a une large gamme de salinité dans laquelle ces bactéries vivent. L'exigence optimale en NaCl est d'environ 2.0 à 3.0% (Aberoumand, 2010). Certaines espèces halophiles requièrent au moins une concentration de 0.5% de NaCl dans le milieu de croissance, alors que d'autres espèces non halophiles, tels que *Vibrio cholerae* peuvent se développer à de faibles concentrations en sel (Gomez-Gil et al., 2004).

Les micro-organismes pathogènes de type *Vibrio* ont été l'un des premiers groupes bactériens à avoir été étudié. Dès 1854, Filippo Pacini a étudié le *Vibrio cholerae* qui est l'agent étiologique du choléra, puis en 1883, Robert Koch prend la relève avec une étude plus poussée de cette bactérie (Thompson et al., 2004). Près d'un siècle plus tard, en 1953, un groupe de chercheurs japonais a découvert *V. parahaemolyticus* (Paris, 2005). Ces deux types de *Vibrio* sont la principale cause de l'intoxication gastro-intestinale chez l'homme dans le monde (Paris, 2005). La phylogénie du genre *Vibrio* a été initialement fondée sur des critères morphologiques et biochimiques, qui ont abouti à de nombreuses réorganisations d'espèces et des transferts entre les genres. La taxonomie actuelle des espèces du genre *Vibrio* est basée sur une approche dite « polyphasique » qui fait référence à une classification tenant compte des données morphologiques, biochimiques, écologiques (niche écologique proche) et génétiques (pour l'affiliation de deux souches à la même espèce il faut au moins 70 % de similarité lors d'hybridation ADN-ADN et plus de 98 % d'homologie des séquences d'ARNr 16S) (Paillard et al., 2004<sub>b</sub>; Thompson & Swings, 2006). Ainsi la comparaison des séquences des gènes *recA*, *rpoA* et l'ADNr 16S a été utilisée en complément de l'hybridation ADN-ADN et des caractères phénotypiques pour reconsidérer la phylogénie des *Vibrio* (Thompson et al., 2004).





**Figure 8.** Phylogénie des vibriens. Séquences concaténées des séquences codants pour les gènes *recA*, *rpoA*, *atpA*, *dnaJ*, *pyrH*, *toxR* et l'ARNr 16s. La zone rouge indique la position de *Vibrio parahaemolyticus*. (<http://www2.ioc.fiocruz.br/vibrio/AVib/Dendro.html> modifié).

La famille des *Vibrionaceae* est un groupe de bactéries très diversifié. Ce groupe contient aussi bien des bactéries libres, symbiotiques que des pathogènes (Walden et al., 2006). Diverses études se sont intéressées dès les années 60 à l'écologie des *Vibrio*. La plupart concernent les espèces pathogènes de l'homme comme *V. cholerae*. Néanmoins, on trouve quelques études focalisées sur la

distribution du genre *Vibrio* sans cibler particulièrement une espèce. Les espèces du genre *Vibrio* sont des bactéries hétérotrophes faisant partie des espèces les plus abondantes parmi les bactéries cultivées de l'environnement marin cela concerne : les eaux côtières, les estuaires, le sédiment, les infrastructures aquacoles (Heidelberg et al., 2002). Ces micro-organismes sont souvent observés en association avec des organismes marins comme les coraux, les poissons, les mollusques, les algues, les crustacés et le zooplancton (Watnick et al., 2001; Thompson et al., 2004). Les *Vibrios* peuvent également survivre dans l'environnement en formant des biofilms ou en entrant dans un état viable mais non cultivable (VBNC). Ecologiquement, les *Vibrios* jouent un rôle très important dans la dégradation de la matière organique. Cette activité de minéralisation permet le transfert du carbone organique dissout vers les maillons les plus élevés de la chaîne trophique. D'autres *Vibrios* jouent un rôle dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) dans les sédiments pollués (Grossart et al., 2005).

Les espèces de *Vibrio* sont transmis à l'homme principalement par les eaux usées ou coquillages, poissons et crustacés contaminés lorsqu'ils sont consommés crus ou partiellement cuits (ICMSF, 1996; De Paola et al., 2000). Les bactéries peuvent persister dans les aliments en fonction de la température de stockage et du pH (ICMSF, 1996) jusqu'à ce que l'aliment soit consommé, ce qui est vecteur des maladies.

L'infection par *Vibrio* est l'un des problèmes importants dans les cultures commerciales de poissons et d'invertébrés marins car il provoque des mortalités par des événements pandémiques dans les écloseries, ainsi qu'en milieu naturel (Paillard et al., 2004<sub>a</sub>, Leyton & Riquelme, 2008; Beaz-Hidalgo et al., 2010) avec les pertes économiques qui en découlent.

Il faut signaler que certains vibrions établissent et maintiennent une relation symbiotique positive avec les organismes marins (Urakawa & Rivera, 2006). En conséquence, de nombreux rapports indiquent que les vibrions sont bénéfiques pour une utilisation potentielle en tant que

probiotiques chez les organismes marins d'importance commerciale et ils ont aussi une importance dans la reminéralisation des éléments tels que le carbone (C), l'azote (N), le phosphore (P), la production d'acides gras polyinsaturés et la dégradation des glucides et des polymères. Ces vibrions contribuent avantageusement à la chaîne alimentaire (Simidu & Tsukamoto, 1985; Urdaci et al., 1988; Nichols, 2003; Sawabe et al., 2003; Li & Roseman, 2004; Farmer & Hickman-Brenner, 2006; Thompson & Polz, 2006).

### 3.1. Les vibrions pathogènes.

#### 3.1.1. Chez les mollusques

De nombreuses études font état de l'isolement de bactéries lors d'épisodes de mortalité de mollusques au stade larvaire, de naissain, d'adulte et sur des populations sauvages ou d'élevage. Leur implication en tant que pathogènes a parfois été vérifiée par reproduction de la maladie en infection expérimentale. Les vibrions affectent les mollusques quels que soit leur famille, genre ou espèce. Par exemple, une souche de *V. lentus* fut incriminée dans une pathologie qui a touché des populations de pieuvres sauvages *Octopus vulgaris* (Farto et al., 2003). *V. alginolyticus* a été impliqué dans des cas d'ulcères cutanés chez la pieuvre *O. joubini* (Hanlon et al., 1984). Cette espèce est aussi associée à des mortalités de l'ormeau *Haliotis diversicolor supertexta* (Liu et al., 2001). D'autres espèces de *Vibrio* ont été identifiées et associées à des pathologies telle que *V. carchariae* et *V. harveyi* chez l'ormeau Européen *H. tuberculata* en France (Nicolas et al., 2002).

Dans la majorité des cas, ces vibrioses atteignent les animaux au stade larvaire en éclosion. Dans les éclosions, lors de la fixation larvaire, ils sont exposés à des concentrations élevées d'agents pathogènes potentiels associés à la surface des bacs, aux larves mortes et aux pseudo fèces (Sutton & Garric, 1993; Aberoumand, 2010). Les larves de *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* et d'autres bivalves cultivés, y compris les palourdes peuvent être affectées. Les infections débutent généralement par l'adhérence des bactéries à la surface extérieure de la coquille des mollusques. Les bactéries forment

des colonies qui se développent dans le manteau entraînant une nécrose de l'épithélium du manteau. Les signes d'infection provoquent une diminution du taux d'alimentation et un comportement de nage erratique, peut-être en raison de dommages du velum. Morphologiquement, les signes sont une nécrose tissulaire et la présence de bactéries en forme de baguette à l'intérieur des tissus des larves et des juvéniles. Les bactéries sont tout d'abord fixées à la surface extérieure de périostracum avec une invasion systématique des tissus (Elston, 1999). Des nombreux rapports de vibriose ont été établis dans les cultures de larves, de post-larves et juvéniles de bivalves en éclosérie, les espèces étant : *V. anguillarum*, *V. algynolyticus*, *V. neptunis*, *V. aesturinus*; *V. ordalli*, *V. tapetis*, *V. tubiashii*, *V. splendidus*, *V. pectinica* et *V. harveyi* (Tubiash et al., 1986; Nicolas et al., 1996; Lambert et al., 1998; Anguinado-Beltran et al., 2005; Paillard et al., 2004<sub>b</sub>; Gómez-Leon et al., 2005; Prado et al., 2005; Labreuche et al., 2006<sub>a</sub>; Sandlund et al., 2006; Garnier et al., 2007; Hasegawa et al., 2008; Gomez-Leon et al., 2008).

Chez les bivalves adultes d'importance commerciale, de nombreuses recherches montrent l'effet négatif de ces micro-organismes sur la survie. Le *Vibrio tapetis* a été décrit comme la bactérie marine responsable de la maladie de l'anneau brun (MAB) chez la palourde *Ruditapes philippinarum* où les bactéries se multiplient rapidement dans les tissus mous, causant de graves dommages et la mort subséquente (Paillard et al., 2004<sub>b</sub>). Par la suite, les travaux de Flye-Sainte et al., (2007) montrent que l'impact de *Vibrio* provoque une perte de poids des individus, par rapport aux animaux non infectés, ce qui indique que la MAB induit un déséquilibre dans le bilan énergétique et une diminution dans l'acquisition de l'énergie et du rythme respiratoire. Garnier et al., (2007) ont analysé les communautés bactériennes dans l'hémolymphe des huîtres moribondes trouvant principalement les espèces *V. aestuarianus* et *V. splendidus*. Le pouvoir pathogène de *V. aestuarianus* a d'abord été suspecté en réalisant des isollements à partir de l'hémolymphe d'huîtres moribondes de plusieurs sites sur le littoral français entre 2001 et 2004. *V. aestuarianus* serait la bactérie majoritairement rencontrée et ce résultat laissait présager l'implication de cette espèce dans les mortalités estivales de l'huître

creuse *Crassostrea gigas* (Ganier et al., 2007). Son pouvoir pathogène a été, par la suite, démontré par des infections expérimentales, qui ont également mis en évidence que la capacité à induire des mortalités chez l'hôte variait selon les souches (Labreuche et al., 2006<sub>a</sub>). Labreuche et al., (2006<sub>b</sub>) ont étudié le rôle dans la virulence des composés extracellulaires (CPs) des différentes souches de *V. aestuarianus* (virulente et non-virulente) sur *C. gigas*. Les résultats ont montré que les CPs de la souche virulente induisent 80 % de mortalité chez l'hôte par rapport aux CPs de la souche non-virulente qui n'induisent, elles, que 25 % de mortalité. Les CPs de la souche virulente contiennent des enzymes ou des toxines telles que la caséinase, la gélatinase, la lécithinase et l'hémolysine qui ne sont pas présentes chez la souche non-virulente. L'activité protéasique est due à une métallo-protéase proche de celle de *V. anguillarum* qui est à l'origine de tous les effets délétères des CPs sur les hémocytes des huîtres. Gay et al., (2004) ont démontré par des infections expérimentales que *V. splendidus* est à l'origine des mortalités des adultes de *C. gigas*. Des études plus récentes ont démontré que les infections expérimentales par des bactéries *V. aestuarianus* et *V. splendidus* produisent des mortalités importantes chez *C. gigas* (De Decker & Saulnier, 2011). En outre, il a été suggéré que *V. harveyi* soit lié aux mortalités massives d'huîtres *Pinctada maxima* et *C. gigas* (Pass et al., 1987; Allain et al., 2009).

### 3.1.1.1. Impact de pathogènes chez l'ormeau

Diverses maladies infectieuses et des mortalités massives causées par les vibrions ont été bien documentées chez les ormeaux (Tableau 3). L'infection systémique des tissus mous de larves et de juvéniles de l'ormeau produise une nécrose des tissus et la mort subséquente dû à des exotoxines bactériennes (Tubiash, 1986). Les Vibrions tels: *V. harveyi*, *V. splendidus* I, *V. tubiashii* et *V. anguillarum* ont été isolés à partir d'ormeaux adultes moribonds issus de l'aquaculture ou du milieu naturel en Australie (Handler et al., 2005). Dans la plupart des cas, la vibriose est facilitée par des



facteurs de stress dans les élevages (par exemple, les températures élevées, la manipulation des animaux, les anesthésies, l'augmentation progressive de la salinité dans le système de recirculation d'eau, etc) (Handler et al., 2002; 2005). En Nouvelle-Zélande, *H. iris* cultivés à fortes densités ont présenté des lésions épithéliales du pied et de l'épipodium qui ont été associées à des infections causées par des bactéries différentes (Diggles & Oliver, 2005). *Vibrio alginolyticus* a été isolé à partir de l'hémolymphe des animaux adultes moribonds de *H. supertexta diversicolor* (Liu et al., 2001; Lee et al., 2001) et il est capable de provoquer des symptômes dans des expériences de challenges bactériens.

Les mortalités causées par *V. alginolyticus* sur les larves et post-larves de *H. rufescens* ont été démontrées à l'échelle expérimentale dans les essais biologiques avec différentes concentrations bactériennes ( $10^2$  à  $10^6$  cellules/mL) (Anguinado-Beltran et al., 1998). En outre, dans les élevages industriels de l'ormeau tropical *H. asisina*, une forte mortalité des juvéniles et des adultes a été signalée à la suite d'infections causées par *Vibrio* spp (probablement *V. alginolyticus* et *V. vulnificus*) (Kua et al., 2011) provoquant une entérite associée à une septicémie hémorragique.

Au Japon, *Vibrio carchariae* (synonyme de *V. harveyi*) a été isolé chez l'ormeau *H. diversicolor supertexta* à partir de pustules blanches constituées de fibres musculaires nécrotiques du pied, qui ont conduit à des mortalités massives de l'animal (Nishimori et al., 1998; Sawabe et al., 2007). Des symptômes similaires (pustules blanches) ont été également observés dans des populations sauvages et d'élevage d'*H. tuberculata* le long de la côte atlantique française, avec des taux de mortalité de plus de 60 % (Nicolas et al., 2002). Travers et al. (2008<sub>c</sub>) ont trouvé des souches de *V. harveyi* responsables de mortalités massives des ormeaux adultes d'*H. tuberculata* en France en période estivale entre 1998 et 2005, à des températures supérieures à 19 °C. D'autre part, Travers et al., (2008<sub>d</sub>) ont établi une relation entre les processus de maturation et de ponte, le statut immunitaire et la susceptibilité de l'ormeau à *V. harveyi* pendant cette période.

En Chine, à partir de 1993, la maladie des pustules blanches a été décrite dans plusieurs structures d'élevage d'ormeaux d'*H. discus hannai*, avec des taux de mortalité de 50-60 % (Li et al., 1998). Différentes souches de *V. fluvialis* II ont été isolées et la maladie a été reproduite en infection expérimentale par injection de ce microorganisme dans le muscle pédieux, ou suite à des blessures provoquées sur le pied suivies d'une balnéation dans une suspension bactérienne. Dans ces deux cas, 100% de mortalités a été obtenu.

*V. parahaemolyticus* a été associée à des mortalités massives chez les larves et post-larves d'ormeau Californien *H. rufescens* (Elston & Lockwood, 1983) et l'ormeau taïwanais *H. supertexta diversicolor* (Liu et al., 2000; Huang et al., 2001; Cheng et al., 2004; Cai et al., 2006<sub>b</sub>; Cheng et al., 2008). L'effet pathogénique de cette bactérie chez l'ormeau sera développé postérieurement dans le point 3.1.2.5 (page 46)

**Tableau 3: Vibrions associés à des maladies et aux mortalités d'ormeaux**

Espèce pathogénique	Espèce d'orveau infectée	Stade infecté	Effet sur l'hôte	Références
<i>V. alginolyticus</i>	<i>Haliotis rufescens</i>	Larves et post-larves	Mortalités massives (95%)	Anguiano et al., 1998
	<i>H. diversicolor supertexta</i>	Petits ormeaux 10-14g	Mortalités massives	Lee et al., 2001
		Petits ormeaux 10-15g	Mortalités massives	Liu et al., 2001
		Post-larves	Mortalités massives (90%)	Cai et al., 2006 <sub>a</sub>
<i>V. anguillarum</i>	<i>H. laevisgata</i> et <i>H. rubra</i>	Ormeaux >10 mm	Vibriosis septicémique Mortalités massives	Handlering et al., 2005
<i>V. fluvialis</i> II	<i>H. discus hannai</i>	Ormeaux 30-80 mm	Mortalités massives (50-100%)	Li et al., 1998
<i>V. harveyi</i>	<i>H. diversicolor supertexta</i>	Petits ormeaux 20 mm	Mortalités massives (95%)	Nishimori et al., 1998
		Ormeaux 10-50 mm	Vibriosis septicémique Mortalités massives (100%)	Sawabe et al., 2007
	<i>H. laevisgata</i> et <i>H. rubra</i>	Ormeaux > 10 mm	Vibriosis septicémique Mortalités massives	Handlering et al., 2005
	<i>H. tuberculata</i>	Adultes matures	Mortalités massives (60-80%)	Nicolas et al., 2002
		Adultes et jeunes matures	Mortalités massives (60-80%)	Travers et al., 2009; 2010
	<i>H. discus hannai</i>	?	Mortalités massives	Fukui et al., 2010
<i>V. tubiashii</i>	<i>H. laevisgata</i> et <i>H. rubra</i>	Ormeaux >10 mm	Vibriosis septicémique Mortalités massives	Handlering et al., 2005
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>H. diversicolor supertexta</i>	Petits ormeaux 10-14g	Whitering Syndrome Mortalités massives (100%)	Liu et al., 2000
		Petits ormeaux 10-14g	Mortalités massives	Lee et al., 2001
		Petits ormeaux	Mortalités massives	Huang et al., 2001
		Petits ormeaux 10g	Mortalités massives (100%)	Lee et al., 2003
		Ormeaux 37-42 mm	Mortalités massives (100%)	Cheng et al., 2004
		Post-larves	Mortalités massives (70%)	Cai et al., 2006 <sub>b</sub>
		Post-larves	Mortalités massives	Cai et al., 2007
		Post-larves	Mortalités massives (80%)	Cheng et al., 2008
	<i>H. rufescens</i>	Ormeaux 20-150 mm	Vibriosis septicémique Mortalités massives	Elston & lockwood, 1983
		Ormeaux 16-45.6 mm	Mortalités massives (100%)	Silva et al., 2013
<i>V. spp</i>	<i>H. asisina</i>	Adultes et jeunes matures	Vibriosis septicémique Mortalités massives	Kua et al., 2011



### 3.1.2 *Vibrio parahaemolyticus*

#### 3.1.2.1. Généralités

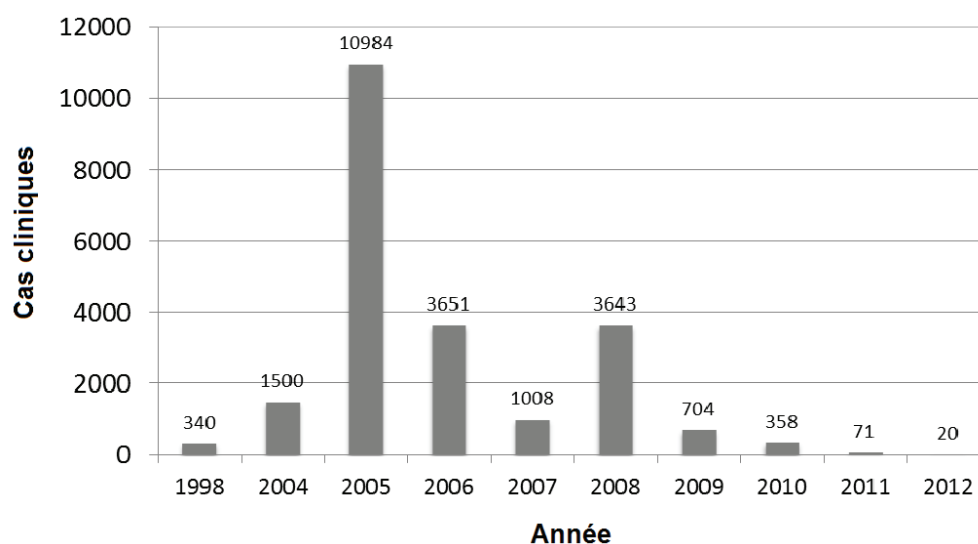
*V. parahaemolyticus* est une bactérie entéro-pathogène gram négatif, mobile, halophile, anaérobie facultative qui est largement distribuée dans le monde (Ray, 1996; Hlady et al., 1996). *V. parahaemolyticus* est l'agent responsable de gastroentérites liées à la consommation de mollusques (notamment les huîtres), de crustacés (comme les crabes) ou de poissons crus (De Paola et al., 2000). *V. parahaemolyticus* est présent dans l'environnement marin (eaux côtières et estuariennes). Il a été isolé à partir des eaux côtières dans de nombreux pays répartis dans les cinq continents (Liston, 1990). Il contamine et affecte les organismes d'élevage comme les mollusques bivalves (huîtres, moules, coquille Saint-Jacques), les mollusques gastéropodes (bigorneaux, ormeaux, escargots), les crustacés (crevettes, crabes, araignées de mer, homards), les céphalopodes (calamars) et les poissons (sardines, anchois, anguilles, mérours, maquereaux...). Le tableau 4 résume l'effet provoqué par cette bactérie chez les espèces cultivées.

**Tableau 4: Infections expérimentales d'animaux d'élevage avec le *Vibrio parahaemolyticus*.**

Organisme hôte	Stade infecté	DL50	Voie d'infection	Effet sur l'hôte	Références
<b>Crustacés</b>					
<i>Penaeus monodon</i>	Crevettes juveniles 8-12g	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> CFU/crevette en 2-7 jours	Injection intramusculaire	Syndrome de la maladie rouge, Mortalités massives (100%)	Alapide-Tendencia & Dureza, 1997
	Crevettes juveniles 12-15g	2.46x10 <sup>7</sup> CFU/0.05 mL en 4 jours	Injection intramusculaire	Mortalités massives (n.d)	Ramalingam & Shyamala, 2006
	Crevettes juveniles	1.0x10 <sup>5</sup> CFU/crevette en 7 jours	Injection intramusculaire	Syndrome de la maladie rouge, Mortalités massives (n.d)	Sudheesh & Xu, 2001
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Post-larves	n.d	Bioncapsulation en nauplii d' <i>Artemia franciscana</i>	Mortalités massives (15%)	Roque et al., 2000
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Crevettes juveniles 10-15g	2x10 <sup>9</sup> CFU/mL en 3 jours	Balnéation	Mortalités massives (80%)	Khuntia et al., 2008
<b>Mollusques</b>					
<i>H. diversicolor supertexta</i>	Petits ormeaux 10-14g	1.6x10 <sup>5</sup> CFU/ormeau 25-26°C (semaine)	Injection intramanteau	Whitening Syndrome, Mortalités massives (100%)	Liu et al., 2000
	Petits ormeaux 10-14g	2.7x10 <sup>6</sup> à 18°C et 8.4x10 <sup>4</sup> à 30°C en 2 jours	Injection intramusculaire	Mortalités massives (n.d)	Lee et al., 2001
	Petits ormeaux 10g	8.36-8.41x10 <sup>4</sup> CFU/ormeau en 2-7 jours	Injection intramanteau	Mortalités massives (100%)	Lee et al., 2003
	Ormeaux 37-42mm	1.6x10 <sup>5</sup> CFU/ormeau à 28°C en 2 jours et 1.6x10 <sup>5</sup> CFU/ormeau à 32°C en 1 jour	Injection intramusculaire	Mortalités massives (100%)	Cheng et al., 2004
	Post-larves	1x10 <sup>3</sup> CFU/mL en 3 jours	Balnéation	Mortalités massives (70%)	Cai et al., 2006 <sub>b</sub>
	Post-larves	3.2x10 <sup>4</sup> CFU/mL en 3 jours	Balnéation	Mortalités massives (80%)	Cheng et al., 2008
<i>H. rufescens</i>	Ormeaux 20-150 mm	n.d	n.d	Vibriosis septicémique, Mortalités massives (n.d)	Elston & lockwood, 1983
	Ormeaux 19-36 mm	1x10 <sup>6</sup> CFU/g en 4 jours	Injection intramusculaire	Mortalités massives (100%)	Silva et al., 2013
<i>Meretrix meretrix</i>	Palourdes adultes	6.0x10 <sup>6</sup> CFU/mL 35-45 mm en 1 jour	Injection intramanteau	Mortalités massives (100%)	Yue et al., 2010
<b>Poissons</b>					
<i>Oreochromis niloticus</i>	Juvenile 135g	n.d	Injection intramusculaire	Mortalités massives (14.3-28.95%) en 1 jour	Balfry et al., 1997
<i>Solea senegalensis</i>	Juvenile 10-15g	1.0-5.0x10 <sup>5</sup> CFU/g	Injection intramusculaire	Mortalités massives	Zorrilla et al., 2003

**n.d : Non déterminé**

Dans les années 50, *V. parahaemolyticus* a été reconnu comme responsable d'une maladie massive de gastro-entérite à Osaka (Daniels et al., 2000) et, depuis lors, de nombreux cas de maladies par cette bactérie ont été signalés en Amérique du Nord, Europe, Asie et en Amérique du Sud (Paris, 2005). Au Chili, *V. parahaemolyticus* a été responsable de 40 à 70% des maladies gastro-intestinales causées par les poissons contaminés et coquillages provenant de milieux marins (DePaola et al., 2000). Ce pathogène a été d'abord détecté dans la ville d'Antofagasta pendant une pandémie durant la saison estivale 1997-1998, avec environ 340 cas cliniques (Cordova et al., 2002). À partir de cette date et jusqu'à l'été de 2005 près de 10.000 cas ont été signalés, respectivement (Gonzalez-Escalona et al., 2005; Heitmann et al., 2005; Fuenzalida et al., 2007). Depuis cette période on peut observer l'apparition de nouveaux cas cliniques, 71 nouveaux cas ont été enregistrés en 2011, dont deux ont eu lieu à Antofagasta (Figure 9) (MINSAL, 2012). Face à ces différents épisodes de maladies, *V. parahaemolyticus* est devenu une priorité de santé au Chili considérant l'impact élevé causé par ce pathogène dans les exploitations aquacoles et dans les activités associés à la pêche.



**Figure 9.** Cas cliniques observés au Chili entre 1998-2011. Graphe élaboré à partir des données du Ministère de la Santé du Chili (MINSAL).

Bien que cette bactérie soit présente dans l'écosystème marin côtier (Leyton & Riquelme, 2008), cela ne signifie pas que le risque d'infection de la population soit constant. C'est parce que dans

l'environnement, *V. parahaemolyticus* est en grande partie non pathogène, généralement moins de 1% de ces bactéries isolées à partir de sources environnementales ont la capacité de produire une infection entérique (Heitmann et al., 2005).

### 3.1.2.2. Habitat et cycle de vie

L'habitat naturel de *V. parahaemolyticus* sont les eaux marines côtières. Elle est l'une des espèces qui compose la flore normale des estuaires, l'eau de mer et certains organismes marins (Lake et al., 2003 ; Burke, 2005). Les populations de *V. parahaemolyticus* sont affectées par les changements de climat, de température, de la salinité et de la disponibilité des nutriments.

*V. parahaemolyticus* est associée à la présence de plancton, invertébré et vertébré pour survivre dans l'environnement marin. Chez les invertébrés, les bivalves accumulent les vibrions au cours du processus de filtration et d'alimentation, atteignant des concentrations jusqu'à 100 fois plus élevés par rapport aux autres espèces (Hernández et al., 2005).

La température optimale de croissance est comprise entre 20 et 30°C, ce qui permet une plus forte concentration de bactéries. Dans les périodes où la température est inférieure à 20 ° C, la densité des bactéries diminue et lorsqu'il atteint 10° C ou moins, la densité de *V. parahaemolyticus* "disparaît" de la colonne d'eau, mais il reste dans les sédiments d'où il émerge lorsque les conditions sont favorables, c'est à dire au moment où il fait chaud (Hervio-Heath et al., 2002). La salinité du milieu requise pour cette bactérie varie de 5 et 30‰. Cette variation saline est en fonction de la température de l'environnement et de la disponibilité des nutriments.

Dans l'écosystème marin, les mollusques bivalves sont les plus grands purificateurs d'eau de mer, car ils filtrent l'eau et absorbent donc les vibrions pathogènes comme *V. parahaemolyticus*, qui provoquent de graves problèmes gastro-intestinaux chez les humains. Une fois à l'intérieur de l'hôte,

*V. parahaemolyticus* doit d'abord survivre à des acides gastriques trouvés dans l'estomac et qui représentent une mesure de défense efficace. Plus tard, quand ils arrivent à la première partie de l'intestin grêle, ces bactéries trouvent de bonnes conditions pour la colonisation et propagation en raison du pH alcalin existant. Le temps de colonisation dure de deux à cinq jours, mais cela peut varier considérablement (Julie et al., 2010).

### 3.1.2.3. Gènes de virulence et les régulateurs.

Le génome de *V. parahaemolyticus* code pour une longue liste de facteurs potentiels de virulence tels que les hémolysines, deux systèmes de sécrétion de type III (T3SS1 et T3SS2), la collagénase, les facteurs d'adhérence, des protéases, et deux systèmes de sécrétion de type VI (T6SS1 et T6SS2) (Makino et al., 2003; Broberg et al., 2010; Hiyoshi et al., 2010). Des études épidémiologiques ont été réalisées pour presque toutes les bactéries *V. parahaemolyticus* isolées à partir de cas cliniques. La capacité de produire  $\beta$ -hémolyse sur un type particulier de Agar sang (Agar Wagatsuma), appelé phénomène de Kanagawa (PK) (Miyamoto et al., 1969) est considéré comme un milieu utile pour distinguer les souches pathogènes et non-pathogènes. La protéine responsable de cette activité hémolytique est la TDH (Thermostable Direct hemolysin) et la TLH (Thermolabile hemolysin). Tandis que le gène de « Thermolabile hemolysin » (*tlh*) est utilisé en tant que marqueur génétique spécifique de *V. parahaemolyticus*, TDH a été considéré comme le principal facteur de virulence de cette bactérie pathogène (Nishibuchi & Koper 1995; Baffone et al., 2005). Ce gène codé en deux copies dans le génome (*tdh1* et *tdh2*) et un (*tdh2*) contribue essentiellement à la production des protéines (Lin et al., 1993). D'autre part, TDH est associé à PK, bien que certaines souches PK-positif n'ont pas le gène TDH, un autre type d'hémolysine a pu être identifié (« TDH-Related Hemolysin » TRH) (Park et al., 2004).

Le séquençage complet du génome de *V. parahaemolyticus* PK-positif souche RIMD2210633 a révélé que cette bactérie a deux groupes de gènes pour le système de sécrétion de type III (T3SS) et un dans chacun des deux chromosomes (appelés T3SS1 et T3SS2, respectivement). En outre, il a été démontré que cette souche n'a pas le gène codant pour TRH, mais il a un îlot de pathogénicité sur le chromosome 2 contenant deux gènes codant pour TDH (*tdhA* y *tdhS*) (Makino et al., 2003; Sugiyama et al., 2008; Noriega et al., 2010). Chaque T3SS semble jouer un rôle différentiel dans la cytotoxicité des cellules en culture et dans les modèles biologiques des infections. T3SS1 est requise pour la cytotoxicité des cellules HeLa, J774, T84 et cellules HT-29 et pour l'hémolyse des globules rouges; T3SS2 est nécessaire pour la cytotoxicité des lignées cellulaires Caco2 et HCT-8 (Ono et al., 2006; Kodama et al., 2007). Plus récemment, en T3SS1 de *V. parahaemolyticus* ont été identifiés 3 gènes pour les protéines VP1698, VP1699 et VP1701 (Kodama et al., 2010) qui partagent des séquences similaires et ils sont fonctionnellement orthologues de ExsD, ExsA et ExsC de *Pseudomonas* (Zhou et al., 2008).

En outre, l'expression de TDH est régulée par le produit codé par les gènes *toxRS* (Lin et al., 1993) ce gène, en dépit d'être largement conservé dans le genre *Vibrio* (Kim et al., 1999) a des régions « espèce-spécifique », ce qui fait de lui un bon marqueur pour la détection de *V. parahaemolyticus* par PCR (Lo et al., 2008). L'opéron impliqué dans la synthèse de la protéine ToxR comprend l'expression de 20 gènes. Cette protéine est divisée en trois domaines : Le premier domaine transmembranaire pour l'ancrage dans la membrane cellulaire ; un deuxième domaine sert de capteur de conditions dans l'espace périplasmique et un troisième domaine cytoplasmique qui a la capacité de se lier l'ADN. Un aspect intéressant de cette protéine est qu'elle contrôle l'expression de gènes présents dans les éléments mobiles, à la fois de la VPI-1 (formation du pili TCP) en tant que phage CTXφ, on peut fixer directement au promoteur *CtxAB* (Waldor & Mekalanos, 1996; Karaolis et al., 1998; Boyd et al., 2000; Zhang et al., 2003)

### 3.1.2.4. Contrôle du quorum sensing (QS).

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication bactérien qui passe par des molécules de signalisation extracellulaire appelées « autoinducteurs » ou AIs. La réponse aux autoinducteurs permet aux bactéries de coordonner l'expression des gènes au niveau populationnel à l'image des organismes pluricellulaires. Cette communication est fonction de la densité cellulaire. En effet, lorsqu'une population bactérienne produit des autoinducteurs, la concentration de ces molécules extracellulaires augmente. A forte concentration, les autoinducteurs induisent des modifications intracellulaires qui se traduisent par le déclenchement de fonctions biologiques comme la sécrétion de facteurs de virulence, la formation de biofilms, le croissence essaim (swarming), la formation d'endospores, la production d'antibiotiques, la conjugaison ou encore la bioluminescence (Nicas & Iglewski, 1985; Kleerebezem et al., 1997; Manefield et al., 1999; Roger & Iglwesi, 2003; Defoirdt et al., 2004; 2006; Schuster & Greenberg, 2006; Ng & Bassler, 2009; Vandeputte et al., 2010; Tan et al., 2012).

Le QS est un système très complexe constitué d'au moins trois voies, classées selon le type d'autoinducteurs et des voies de détection impliquées. Les bactéries gram positives et les bactéries gram négatives utilisent le QS pour réguler diverses activités physiologiques. En général, les gram-négatives utilisent la molécule, N-acyl-homosérine-lactone (AHL) et les gram positives les oligopeptides comme autoinducteurs. L'AHL est le produit d'un des gènes lux (*luxI*) qui code l'acyl homoserine lactone synthase, LuxI. Sa concentration augmente lorsque la densité des cellules s'accroît. Une fois qu'une concentration seuil de cette molécule est atteinte, la molécule est fixée par le peptide LuxR (codé par le gène *luxR*) qui ensuite régule l'expression de l'opéron lux (Fuqua & Greenberg, 2006). Ce premier système a été mis en évidence chez *V. fischeri* et serait conservé chez plus de 70 espèces de bactéries Gram négatives.

Le second système, caractéristique des bactéries Gram positives repose sur la production d'oligopeptides autoinducteurs sécrétés via des transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) et détectés par un système à deux composants, basé sur des histidines kinases. Le système à deux composants passe par une étape d'autophosphorylation du récepteur, en réponse à la liaison des oligopeptides qui est transduite par la phosphorylation et donc l'activation d'une protéine régulatrice, capable d'activer ou de réprimer l'expression de gènes cibles (Pestova et al., 1996 ; Kleerebezem et al., 1997).

Le troisième type de système est beaucoup plus complexe que celui décrit précédemment et a généralement deux ou plusieurs molécules autoinductrices (Marquina & Santos de Sen, 2010). Ce système a été identifié chez *V. harveyi*. Il s'appuie sur trois autoinducteurs : AI-1, une homosérine lactone classique des bactéries Gram négatives synthétisée par le gène *luxM* et reconnu par la kinase LuxN (Bassler et al., 1993); et AI-2, un furanosyl borate diester synthétisé par le gène *luxS* et reconnu par la kinase LuxQ (Schauder et al., 2001; Chen et al., 2002); et enfin, le dernier autoinducteur identifié (mais dont la structure chimique n'est toujours pas connue), CAI-1 (Cholerae Autoinducer 1), passant par la voie Cqs (Henke & Bassler, 2004<sub>a</sub>; Kelly et al., 2009).

Cependant, le QS n'a pas été étudié de façon approfondie chez *V. parahaemolyticus*. Defoirdt et al., (2006), dans une étude réalisée sur la capacité pathogénique de *V. parahaemolyticus* à causer une maladie chez *Artemia franciscana*, ont démontré que cette bactérie produit AI-2 qui régule la virulence dans l'hôte. Peu d'informations sur la détection du QS chez *V. parahaemolyticus* sont disponibles du fait que les archétypes des souches de cette bactérie semblent défectueux dans la régulation dépendante de la densité cellulaire (Gode-Potratz & McCarter., 2011). Plus précisément, les études suggèrent que la voie de QS réprime les deux traits les plus caractéristiques de l'espèce : la croissance en «swarming» et la virulence ; cette variation de QS sélectionne le type de mobilité sur la surface et le type de cellule pathogène (McCarter, 1998; Henke et al., 2004<sub>b</sub>; Jaques & McCarter, 2006). Le régulateur transcriptionnel de *V. parahaemolyticus* reçoit le nom d'OpaR (« Colony



Opacity ») qui induit l'expression des polysaccharides extracellulaires (McCarter, 1998). *V. parahaemolyticus* subit une variation de phase réversible et forme différentes morphologies coloniales bactériennes: opaque (OP) et transparente (TR) (McCarter, 1999). Bien que les souches OP et TR forment un biofilm, leur architecture et leur intégrité structurale sont différentes en raison de différences dans la formation d'exopolymère capsulaire et d'autres molécules de la surface cellulaire (Enos-Berlage et al., 2005). La protéine OpaR régule positivement les gènes *cps* (Capsular polysaccharide) et négativement les gènes des flagelles latéraux, contrôle la variation entre les types OP et les types de cellules TR et réprime les gènes qui contrôlent le «swarming» (Guvener & McCarter, 2003; Jaques & McCarter, 2006 ; Gode-Potratz & McCarter, 2011). Ce régulateur sert de «output regulator" terminal de la cascade du quorum sensing à vibrions. A des densités cellulaires faibles OpaR est inhibé par les petits ARN appelés régulateurs Qrrs qui sont induits par la protéine phosphorylée LuxO et, lorsque les densités cellulaires sont élevées, LuxO est déphosphorylé et OpaR est produite (Milton, 2006). Plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la virulence, la traduction du signal et la modulation de molécule de signalisation GMP cyclique sont régulé par OpaR. Le QS contrôle un réseau d'expression génique chez *V. parahaemolyticus* qui est très différent d'autres vibrions, par rapport aux gènes contrôlés par opaR (Gode-Potratz & McCarter, 2011).

### 3.1.2.5. Effet de *V. parahaemolyticus* chez l'ormeau

La première étude qui a démontré l'implication de *V. parahaemolyticus* dans les mortalités massives d'ormeaux adultes (*H. diversicolor supertexta*) a été réalisée par Liu et al., (2000). Cette bactérie pathogène a été isolée à partir de l'hémolymph de ormeaux adultes moribonds et morts pendant une épidémie de la maladie «Withering Syndrome» (WS) en 1998. Dans cette étude, les bactéries et leurs CPs étaient virulents et mortels avec une  $DL_{50}$  de  $1.6 \times 10^5$  UFC/g poids corporel et 7,58 µg protéines/g poids corporel. Les travaux de Huang et al., (2001) ont démontré que *V.*

*parahaemolyticus* et leur CPs sont les causes de WS chez cette espèce d'orveau. De plus, le facteur thermique différentiel augmente fortement la mortalité des organismes. Dans le même sens, Cheng et al., (2004) ont démontré que les orveaux maintenus à une température de 28°C et déjà infectés par les bactéries pathogènes ont une mortalité qui augmente de manière significative quand ils sont transférés à une température de 32°C en conséquence d'une faible capacité immunitaire et de résistance face au *V. parahaemolyticus*. Les études ci-dessus ont démontré la virulence de *V. parahaemolyticus* seulement chez les orveaux adultes de *H. diversicolor supertexta* (Liu et al., 2000; Huang et al., 2001; Lee et al., 2003; Cheng et al., 2004). Cependant, les travaux de Cai et al., (2006) ont permis d'isoler la souche de *V. parahaemolyticus* à partir de mortalités massives de post-larves de cette espèce en Chine. Les résultats montrent que cette bactérie est très virulente à très faible concentration (DL<sub>50</sub> de 1,0 x 10<sup>3</sup> UFC / mL). Des études dans le même sens ont été réalisées par Cheng et al., (2008). Les résultats obtenus montrent une dose létale DL<sub>50</sub> de 3,2 x 10<sup>4</sup> UFC/mL et une dose létale de CPs à une concentration de 3,77 mg de protéine/mL, concluant que les bactéries sont responsables de la mortalité des post-larves et que leurs CPs sont impliqués dans la pathogénicité de la maladie causée par la bactérie. Ces mêmes auteurs suggèrent que les CPs de *V. parahaemolyticus* ont une forte activité enzymatique des protéases et d'amylases et une faible activité de lipase, phospholipase et hémolytique produisant une dégradation totale ou partielle des tissus de postlarves.

#### 4. Rôle des probiotiques dans les activités aquacoles : Généralités

Le développement rapide de l'aquaculture, son intensification, et l'apparition des crises sanitaires dans les élevages ont encouragé les recherches pour développer des solutions alternatives aux antibiotiques, afin d'enrayer les maladies. C'est dans ce cadre que l'utilisation des probiotiques, qui concernait à l'origine l'homme et les animaux d'élevage terrestres, a été élargie aux animaux aquatiques depuis une trentaine d'années. Les premières études chez les poissons ont montré des résultats prometteurs qui ont entraîné de nombreuses recherches sur le sujet. Ces recherches ont eu comme objectif la sélection des souches probiotiques à partir des différentes sources d'élevage (animaux, algues, eau....), afin d'évaluer leurs bienfaits sur la survie et la croissance des animaux modèles. Parallèlement à ces recherches, de nombreuses applications, plus ou moins empiriques, du concept probiotique ont été réalisées, ce qui a permis la familiarisation et l'utilisation de ce concept en aquaculture.

##### 4.1. Définition des micro-organismes probiotiques

Tout au long de l'histoire le concept de "probiotique" a acquis une grande variété d'utilisations. Son concept est né dans le début du XXe siècle avec les travaux de Metchnikoff en 1907 (Gillor et al., 2008) qui a fait valoir l'apport bénéfique de micro-organismes comme un mécanisme de contrôle efficace contre l'établissement de micro-organismes pathogènes. Lilly & Stillwell (1965) ont d'abord défini le concept de probiotique comme « *Substances produites par des micro-organismes qui favorisent la croissance d'autres micro-organismes* ». En 1974, Parker définit les probiotiques comme « des organismes et des substances qui contribuent à l'équilibre microbien intestinal ». Cette définition peut inclure des antibiotiques ou des acides gras à chaîne courte, mais cette définition nécessite l'incorporation d'autres composants pour avoir plus de précision. Fuller (1989) a proposé un autre concept « *Complément alimentaire microbien vivant qui affecte avantageusement l'animal hôte en*

*améliorant l'équilibre microbien intestinal* ». Plus tard, Tannock (1997) remarque que l'effet sur l'équilibre intestinal n'est pas représenté dans la plupart des cas, suggérant la définition des probiotiques comme « *Des cellules microbiennes vivantes additionnées dans le régime alimentaire afin d'améliorer la santé* ». Cependant, toutes ces définitions ne sont pas toutes applicables en aquaculture. Il faut signaler que le milieu aquatique est un moyen de diffusion des micro-organismes et un moyen important d'exposition des probiotiques chez les organismes hôtes. Gatesoupe (1999) a modifié le concept de probiotique et propose des voies alternatives de l'incorporation de ces micro-organismes « *Cellules microbiennes administrées de sorte qu'elles entrent dans le tractus gastro-intestinal pour améliorer la santé de l'organisme hôte* ». Gram et al., (1999) a élargi la définition par « *un supplément microbien vivant qui affecte avantageusement l'animal hôte en améliorant l'équilibre microbien* ». Par la suite, Verschuere et al., (2000) ont proposé une définition qui comprend une étroite interaction entre l'aquaculture et l'environnement. Selon ces auteurs un probiotique est « *Un supplément microbien vivant qui a un effet bénéfique sur l'hôte en modifiant la communauté microbienne associée à l'hôte ou à l'environnement, assurant une meilleure utilisation de la nourriture ou l'augmentation de sa valeur nutritive, par l'amélioration de la réponse de l'hôte aux maladies, ou par l'amélioration de la qualité de leur environnement* ». Sur la base des définitions citées précédemment, la FAO/OMS (2001) propose une définition des probiotiques qui couvre la notion de probiotique comme complément alimentaire et comme aliment dans un organisme hôte. « *Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte* ».

Depuis lors, l'utilisation des bactéries bénéfiques comme contrôle biologique dans la production d'animaux terrestres a été largement étudiée. Aujourd'hui, avec l'augmentation de la résistance aux antibiotiques des espèces pathogènes, un certain nombre d'études a été mené pour la caractérisation des souches bactériennes bénéfiques présentes dans les centres d'aquaculture, afin de prévenir des maladies et pour augmenter la production des organismes en cultures. Les bactéries

bénéfiques ont été utilisées pour la décomposition de la matière organique, la réduction des concentrations d'azote et de phosphore, l'amélioration de la croissance des algues, pour contrôler l'ammonium et nitrite et enfin pour augmenter la survie des animaux d'élevage (Boyd & Massaut, 1999). Cette diversité des usages, a créé une confusion concernant le concept original et dans l'usage du terme de probiotique, qui est utilisé en référence à des bactéries ou des algues pour améliorer la qualité de l'eau dans les élevages, et en laissant de côté le concept initial qui englobe la colonisation chez l'hôte. Selon Karunasagar et al., (1999) le terme le plus approprié dans ces cas serait "bioremédiateur", et le concept de probiotique est réservé exclusivement aux cellules microbiennes qui restent en vie dans l'hôte (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999) et sont capables d'améliorer la santé par rééquilibrage microbien interne (Gram et al., 1999). Pour considérer un micro-organisme probiotique, on doit démontrer par différentes techniques, scientifiquement, ses effets bénéfiques pour la santé et corroborer l'efficacité et la sécurité de l'effet produit par l'agent probiotique (Guarner et al., 2010).

#### **4.2. Utilisation des probiotiques pour la prévention de maladies et l'amélioration de l'état nutritionnel en aquaculture de mollusques.**

Un large spectre de bactéries a été proposé et évalué comme agents de contrôle biologique et d'amélioration de l'état nutritionnel des organismes cultivés d'intérêt économique. Les micro-organismes utilisés en aquaculture sont des bactéries du genre *Vibrio*, *Bacillus*, *Neptunomonas*, *Phaeobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromona*, bien que de nombreux autres genres ou espèces aient été testés. (Gatesoupe, 1999; Verschuere et al., 2000; Irianto & Austin, 2000<sub>a</sub>; Gram & Ringo, 2005; Balcazar et al., 2006; Vine et al., 2006; Kesarkodi-Watson et al., 2008; Prado et al., 2010; Dimitroglou et al., 2011; Kesarcodi-Watson et al., 2012).

Egalement, ont été utilisé des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* ou *Bifidubacterium* et la levure, essentiellement du genre *Saccharomyces* (Garcia et al., 2011; Talpur et

al., 2011) qui ont été isolées à partir d'organismes sains. Il y a un autre terme également et qui tend à se confondre avec les probiotiques, les « prébiotiques » qui sont des « aliments non vivants (principalement des fibres) dont la consommation confère un avantage pour la santé de l'hôte associé à la modulation de la microflore » (Caceres & Gotteland, 2010).

De nombreux travaux ont été réalisés afin de résoudre le problème des infections bactériennes dans les différents stades ontogéniques des mollusques à l'origine des nombreux épisodes de mortalités. Ces différentes recherches sont présentées dans le tableau 5.

**Tableau 5: Microorganismes probiotiques utilisés dans la culture des mollusques.**

Probiotique	Espèces cibles	Voie d'incorporation	Effet sur les espèces cibles	Références
<i>Flavobacterium</i> sp. P14	<i>Pecten ziczac</i>	Balnéation	Activité antibactérienne ( <i>Vibrio anguillarum</i> ) chez les larves	Lodeiros et al., 1989
<i>Alteromonas</i> sp. CA2	<i>Crassostrea gigas</i>	Balnéation	Amélioration de la survie et de la croissance larvaire	Douillet & Langdon, 1993; 1994
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> INH	<i>Argopecten purpuratus</i>	Balnéation	Protection contre l'infection; Activité antibactérienne ( <i>V. anguillarum</i> ) des larves	Riquelme et al., 1996
<i>Pseudomonas</i> sp. 11 et <i>Vibrio</i> sp. C33	<i>A. purpuratus</i>	Balnéation	Protection contre l'infection; Activité antibactérienne ( <i>V. anguillarum</i> ) chez les larves	Riquelme et al., 1997
<i>Aeromonas media</i> . A199	<i>C. gigas</i>	Balnéation	Amélioration de la survie; Activité antibactérienne ( <i>V. tubiashii</i> ) des larves	Gibson et al., 1998
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> BS107	<i>P. maximus</i>	Balnéation	Amélioration de la survie; Activité antibactérienne ( <i>V. pectenecida</i> ) chez les larves	Ruiz-Ponte et al., 1999
<i>Arthrobacter</i> sp. 77	<i>A. purpuratus</i>	Balnéation	Amélioration de la survie larvaire	Riquelme et al., 2000
Mélanger de <i>V.</i> sp. C33, <i>Ps.</i> sp 11 et <i>Bacillus</i> sp. B2	<i>A. purpuratus</i>	Balnéation	Amélioration de la survie chez les larves	Riquelme et al., 2001
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. X153	<i>P. maximus</i>	Balnéation	Amélioration de la survie chez les larves	Longeon et al., 2004
Mélange de <i>V. midae</i> . SY9, <i>Cryptococcus</i> sp. SS1 et <i>Debaryomyces hansenii</i> AY1	<i>Haliotis midae</i>	Nourriture artificielle	Protection contre l'infection et amélioration de la croissance des juvéniles et des adultes	Macey & Coyne, 2005
<i>Ph. gallaeciensis</i> . 154	<i>Ostrea edulis</i>	Balnéation	Amélioration de la survie; Activité antibactérienne chez les larves	Prado, 2006
<i>Pseudoalteromonas</i> sp C4	<i>H. midae</i>	Nourriture artificielle	Amélioration de la croissance, l'état nutritionnel et la digestibilité des aliments chez les juvéniles	ten Doeschate & Coyne, 2008
Souches bactériennes non identifiées	<i>Perna canaliculus</i>	Balnéation	Activité antibactérienne ( <i>V. splendidus</i> et <i>V.</i> sp D01)	Kesacordi-Watson et al., 2009
<i>Pediococcus</i> sp. Ab1	<i>H. gigantea</i>	Nourriture artificielle	Amélioration de l'état nutritionnel des juvéniles	Iehata et al., 2010
Souche OY15	<i>C. virginica</i>	Balnéation	Amélioration de la survie; Activité antibactérienne chez les larves	Lim et al., 2011
Mélange de <i>V.</i> sp. C21 ; <i>V.</i> sp. F15 et <i>Agarivorans albus</i> F1	<i>H. rufescens</i>	Macroalgues	Amélioration de la survie et de la croissance ; Activité antibactérienne ( <i>V. parahaemolyticus</i> ) des juvéniles	Silva et al., 2011a
Probiotique commercial Epicin-Hatchery® et Bactosafe®	<i>Nodipecten ubnodusus</i>	Microalgues	Amélioration de la croissance des larves	Granados & Amores, 2012
<i>Alteromonas macleodii</i> 0444, <i>Neptunomonas</i> sp. 0536, <i>Ph. gallaeciensis</i> . 154, <i>Pseudoalteromonas</i> sp D41	<i>P. maximus</i>	Balnéation	Protection contre des bactéries pathogènes <i>V. coralliilyticus</i> et <i>V. splendidus</i>	Kesacordi-Watson et al., 2012
<i>Al. macleodii</i> 0444° N. sp. 0536° <i>Ph. gallaeciensis</i> . 154* <i>Pseudoalteromonas</i> sp D41*	<i>O. edulis</i> et <i>C. gigas</i>	Balnéation	°* Protection contre des bactéries pathogènes ° <i>V. coralliilyticus</i> et <i>V. pectenecida</i> chez <i>O. edulis</i> , *Protection contre <i>V. coralliilyticus</i> chez <i>C. gigas</i>	Kesacordi-Watson et al., 2012



#### 4.2.1. Application des probiotiques chez l'ormeau *H. rufescens*

L'un des principaux défis dans le développement et l'utilisation de bactéries probiotiques est le choix d'une méthode appropriée de colonisation bactérienne efficace et économiquement viable. Jusqu'à présent, des études ont été faites sur l'utilisation de bactéries probiotiques chez l'ormeau pour améliorer la croissance et l'état immunitaire grâce à l'utilisation des algues sous forme de granulés et d'algues fraîches comme vecteurs d'entrée de ces bactéries dans l'appareil digestif des organismes expérimentaux. (Macey & Coyne, 2005; 2006; ten Doeschate & Coyne, 2008; Iehata et al., 2009; 2010; Silva et al., 2011<sub>a</sub>).

#### 4.3. Les critères de sélection des bactéries probiotiques

L'un des principaux problèmes dans l'obtention des bactéries probiotiques, c'est la stratégie de sélection. Selon Gomez-Gil et al., (1998) dans de nombreux cas, le processus de sélection utilisé est empirique et avec des preuves scientifiques limitées. Il est essentiel que les bactéries candidates répondent à certaines exigences. Des critères tels que le potentiel de colonisation, la capacité de compétence contre des agents pathogènes et la capacité d'augmenter la résistance aux maladies sont des éléments importants à prendre en considération dans la sélection des probiotiques (Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil et al., 2000; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Prado et al., 2010; Guarner et al., 2010; Domitroglou et al., 2011). Naturellement, les souches doivent être bénéfiques pour l'animal. Dans l'hôte, elles doivent être présentes en grand nombre, et être en mesure de survivre au sein de l'organe colonisé, sans incidence sur la croissance ou d'induire la résistance aux antibiotiques affectant la thérapie. (Fuller, 1989; Gueimonde & Salminen, 2006). D'autres critères sont à prendre en compte dans la sélection d'un bon probiotique comme: le taux de croissance des probiotiques, la composition du milieu de culture, les conditions de croissance *in vitro*, la concentration initiale d'inoculum, les processus d'extraction et d'élaboration de probiotiques (Del Piano et al., 2006; Ávila et al., 2010).

Enfin, elles doivent être stables dans les systèmes de stockage et permettre la production en grands volumes (Avila et al., 2010).

#### 4.4. Voies d'incorporation de bactéries probiotiques

L'un des défis lorsqu'on commence à utiliser des probiotiques en aquaculture est l'ajout de probiotiques dans l'organisme hôte. Selon la littérature, les alternatives suivantes peuvent être utilisées (Verschuere et al., 2000):

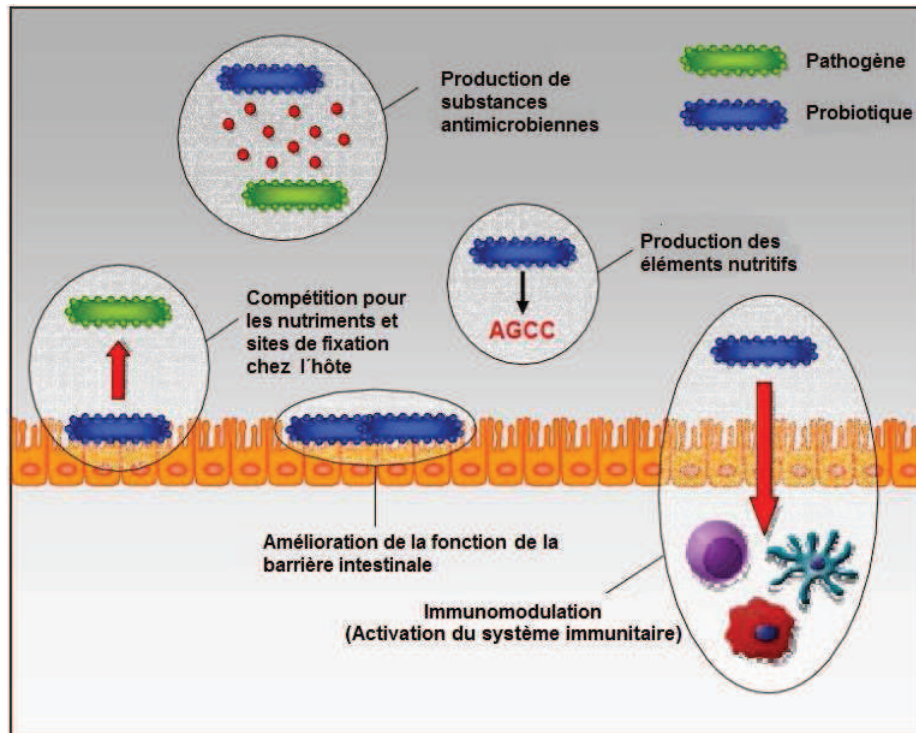
- Balnéation de l'hôte dans une suspension de micro-organismes probiotiques.
- Addition de micro-organismes probiotiques dans l'eau des bacs.
- Addition via de la nourriture artificielle dans les animaux en culture.
- Addition via la nourriture vivante (artémias et rotifères).

La plupart des travaux réalisés font état d'une addition directe des probiotiques dans l'eau de la culture (Ravi et al., 2007; Makridis et al., 2008; Fjellheim et al., 2010; Liu et al., 2010; Pai et al., 2010; Talpur et al., 2011) ou dans le régime alimentaire (nourriture artificielle ou vivante) (Macey & Coyne, 2006; Planas et al., 2006; Aly et al., 2008; Iehata et al., 2010; Thompson et al., 2010; Castro-Barrera et al., 2011; Silva et al., 2011<sub>a</sub>; Talpur et al., 2011). Toutes ces voies d'incorporation ont besoin d'ajouts multiples et continus de probiotiques pour assurer leur efficacité et performance dans les systèmes de culture.

#### 4.5. Possible mode d'action des bactéries probiotiques

A l'heure actuelle, peu d'informations sont disponibles pour élucider complètement le mode d'action de micro-organismes probiotiques *in vivo* dans le domaine de l'aquaculture (Prado et al., 2010), de plus, les études *in vitro* ne montrent pas nécessairement les mêmes résultats que les études

*in vivo* (Verschuere et al., 2000; Gram et al., 2001). Ces micro-organismes peuvent exercer leurs effets probablement par des mécanismes d'action collective sur l'hôte (Gomez et al., 2007). Les mécanismes d'action possibles sont représentés sur la figure 10, et certains d'entre eux seront développés ci-après.



**Figure 10.** Possibles mécanismes d'action exercée par des bactéries probiotiques.

#### 4.5.1. Production de composés antimicrobiens

L'antagonisme bactérien est un phénomène commun dans la nature, par conséquent, les interactions microbiennes jouent un rôle important dans l'équilibre de la compétition entre les micro-organismes bénéfiques et pathogènes (Balcazar et al., 2004). Également les micro-organismes peuvent être une source de produits extracellulaires variés qui ont des effets inhibiteurs sur la croissance microbienne pathogène (Das et al., 2006). Les composés antagonistes sont définis comme substances chimiques, protéiques et non protéiques produites par les micro-organismes probiotiques. Ces composés peuvent être toxiques (bactéricide) ou inhibiteurs (bactériostatique) contre d'autres micro-organismes. Si le microorganisme produisant de tels composés dans l'intestin ou à la surface de l'hôte

ou dans l'eau de la culture, ils sont utilisés pour empêcher et éliminer la prolifération de micro-organismes pathogènes. Les composés antibactériens peuvent être divisés en composés ayant un effet direct et indirect sur les agents pathogènes. Des exemples de composés ayant une activité antimicrobienne sont des antibiotiques, bactériocines, les sidérophores, les lysozymes, les protéases, le peroxyde d'hydrogène, l'ammonium et des acides organiques.

De nombreuses études *in vitro* ont montré que divers micro-organismes peuvent inhiber la croissance de pathogènes en aquaculture (Wycterdahl et al., 1991; Bergh, 1995; Sugita et al., 1997; Jorquera et al., 2000; Longeon et al., 2004; Bruhn et al., 2005<sub>a</sub>; Jayaprakash et al., 2005; Rattanachuay et al., 2010; Bjornsdottir et al., 2010; Lim et al., 2011). Cependant, ces résultats ne garantissent pas que les probiotiques ont les mêmes effets dans les études *in vivo* Gram et al., (2001).

Dans la littérature des probiotiques, peu d'informations sont disponibles sur la structure moléculaire des composés antibactériens et de leurs modes d'action dans les études *in vivo*. Certaines études suggèrent que l'effet des probiotiques est induit par la production de composés antagonistes, mais ces composés ne sont pas toujours identifiés (Maeda & Liano, 1992; Maeda, 1994; Riquelme et al., 1997; Gibson et al., 1998; Ruiz- Ponte et al., 1999; Jorquera et al., 2000; Bruhn et al., 2005<sub>b</sub>; Planas et al., 2006; Porsby et al., 2008). Si le mécanisme d'action d'un microorganisme probiotique est dû à un composé antagoniste, alors le développement de la résistance à ce composé doit être pris en compte. Le traitement par micro-organismes probiotiques sera inefficace dans le contexte de l'aquaculture si les bactéries pathogènes développent une résistance à ces composés.

Par ailleurs, l'origine des souches probiotiques est un facteur important dans le test de l'antagonisme. Les micro-organismes présentent différentes activités biochimiques et physiologiques tout au long de son développement et en fonction de leur milieu d'origine. Ces caractéristiques influent sur le potentiel des probiotiques pour les sites de attachement (Vanbelle et al., 1990) et pourrait créer une fausse impression sur la capacité d'inhibition *in vivo* des probiotiques.

#### 4.5.2. Compétition pour les nutriments et sites de fixation chez l'hôte.

La compétition pour les nutriments est considérée comme un mécanisme d'action de ces micro-organismes probiotiques qui peuvent interférer avec la composition de la disponibilité trophique dans l'eau de culture, dans le tractus gastro-intestinal ou à la surface de l'hôte. Parmi les micro-organismes il y a une compétition pour les nutriments dans le milieu et pour l'énergie qui pourraient être obtenue à partir de ceux-ci (Verschuere *et al.*, 2000). Une molécule chimique importante pour ces micro-organismes est le fer, elle confère une meilleure assimilation des nutriments (Hider & Kong, 2010).

Les organismes sécrètent des sidérophores, qui sont des molécules de faible poids moléculaire qui permettent la dissolution du fer précipité et le rend disponible pour la croissance des organismes (Holmstrom & Gram, 2003; Doherty, 2007; Ratledge, 2007). Dans un écosystème, les colonisateurs dominants ont des systèmes plus performants de « sidérophore-fer » qui permettent d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes, les privant de cet élément (Wyckoff et al, 2007; Hider et Kong, 2010). Si un microorganisme probiotique utilise des sidérophores comme mécanisme d'inhibition, ce probiotique séquestrerait le fer de l'environnement et il limiterait la croissance des bactéries pathogènes des animaux en aquaculture (Gatesoupe, 1997; Gram et al., 1999; Holmstrøm & Gram, 2003; Spanggaard et al., 2001; Laloo et al., 2007). La capacité de s'attacher sur la muqueuse gastro-intestinale est nécessaire pour qu'une bactérie puisse s'établir dans le tractus digestif (Andlid, 1995). Différentes stratégies d'adhésion sont mises en place par les micro-organismes sur les sites de liaison: les forces passives, les interactions électrostatiques, des forces hydrophobes, des forces stériques, des acides lipotéichoïques, et des structures d'adhésion spécifiques (Salyers & White, 2002). Lors de l'utilisation de bactéries probiotiques, l'adhésion est importante pour la colonisation de ces bactéries et ainsi inhiber la fixation et la prolifération de bactéries pathogènes dans l'intestin. Ce phénomène est connu sous le nom d'exclusion compétitive et si cela n'est pas réalisé, les bactéries bénéfiques sont considérées comme des micro-organismes en transit et sont éliminées avec les fèces sans avoir exercé leur fonction probiotique correctement (Gatesoupe, 1999; Wang et al., 2008; Laloo et al., 2010; Lara-

Flores, 2011). L'industrie de l'aquaculture a utilisé des produits probiotiques conçus pour l'adhésion d'une collection de micro-organismes sur la surface des muqueuses intestinales fondée sur le principe d'exclusion compétitive (Verschuere et al., 2000; Farzanfar, 2004). Ces facteurs sont importants pour l'adhésion dans les cellules épithéliales de l'intestin ou l'activation du système immunitaire, et contribuant ainsi à une meilleure homéostasie physiologique et un bon fonctionnement de la digestion intestinale des organismes (Aguirre-Guzman, 1992; Farzanfar, 2004).

### 4.5.3. Quorum quenching (QQ).

Ces dernières années, différents auteurs ont exploré diverses stratégies alternatives pour le contrôle des maladies infectieuses, en particulier dans le domaine des vaccins et des probiotiques (Wang et al., 2008; Tinh et al., 2008). Comme de nombreuses bactéries pathogènes qui régulent l'expression des gènes, y compris les facteurs de virulence, par des systèmes de QS, ce type de communication bactérienne a été proposé comme une méthode prometteuse pour le contrôle des agents bactériens pathogènes (Dong et Zhang, 2005; Dong et al., 2007), en particulier dans le domaine de l'aquaculture (Defoirdt et al., 2004). En effet, lorsque ces systèmes de communication sont bloqués, la virulence est entravée dans de nombreux pathogènes, facilitant l'élimination des bactéries par le système immunitaire. Cette nouvelle stratégie a été génériquement dénommée «Quorum Quenching» (QQ).

Plusieurs études démontrent l'importance des systèmes QS basé sur AHLs (facteur de régulation de virulence) dans l'environnement marin. Ainsi, dans une étude sur des bactéries isolées à partir de différents milieux marins, la moitié des alpha-protéobactéries produisent des signaux AHL (Wagner-Dobler et al., 2005) et de nombreux agents pathogènes se trouvant dans les activités aquacoles comme: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *Edwardsiella tarda* o *Tenacibaculum*

*maritimum* produisent également des signaux AHLs (Croxatto et al., 2002; Buch et al., 2003; Kim et al., 2003; Bruhn et al., 2005<sub>b</sub>; Han et al., 2010; Romero et al., 2010).

Dans le système de communication bactérienne QQ, on a trouvé également des preuves pour soutenir l'importance de ces processus dans le milieu marin. Les furanones de l'algue rouge *Delisea pulchra* sont inhibiteurs des AHLs. Ces molécules ont une structure similaire aux signaux d'AHL de sorte qu'elles participent comme antagonistes dans le site de liaison au niveau du récepteur par l'autoinducteur et bloquent ainsi les circuits du QS des bactéries. Récemment a été isolée une bactérie marine, *Halobacillus salinus* qui a une activité inhibitrice de AHL par la production de phenethylamides (Teasdale et al., 2009). Par ailleurs dans les organismes marins comme les bryozoaires *Flustra foliacea*, les éponges *Luffariella variabilis* et les algues *Ahnfeltiopsis flabelliformis* également on a décrit une activité QQ de type inhibitrice contre AHLs (Peters et al., 2003; Kim et al., 2007; Skindersoe et al., 2008). Ces investigations ont eu une attention particulière pour l'application de stratégies biotechnologiques basées sur QQ pour contrôler les infections bactériennes en aquaculture. Ainsi, l'utilisation de la furanone C-30 a réduit significativement la pathogénicité de *V. anguillarum* chez *Oncorhynchus mykiss* (Rasch et al., 2004).

Les furanones inhibent également la pathogénicité de *V. harveyi*, *V. campbellii* et *V. parahaemolyticus* chez les rotifères et *Artemia* sp, mais ces molécules sont toxiques, l'utilisation de ces composés naturels se voit limitée et rend nécessaire la recherche d'autres molécules tout aussi puissantes, mais moins toxiques. En ce qui concerne à la dégradation du signal AHL, il a été démontré que les consortiums bactériens intestinaux protègent les larves des crevettes, des poissons et des rotifères des infections bactériennes (Tinh et al., 2007; Nhan et al., 2010; Chen et al., 2010).



#### 4.5.4. La stimulation du système immunitaire

Le système immunitaire non spécifique peut être stimulé par les probiotiques. Il a été montré que l'administration orale de *Clostridium butyricum* chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) améliore la résistance à la vibriose, à travers l'augmentation de l'activité phagocytaire des leucocytes (Sakai et al., 1995). Rengpipat et al., (2000) indiquent que l'utilisation de *Bacillus* sp. (Souche S11) offre une protection contre les maladies en activant les défenses cellulaires et humorales immunitaires chez la crevette *Penaeus monodon*. Les travaux de Balcazar (2003) ont démontrés que l'administration d'un mélange de souches bactériennes (*Bacillus* et *Vibrio* sp) a eu une action positive sur la croissance et la survie des juvéniles de la crevette blanche fournissant un effet protecteur contre le système immunitaire par l'augmentation de la phagocytose et la activité antibactérienne. En outre, Nikoskelainen et al., (2003) ont montré que l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* à une concentration de  $10^5$  UFC/g, a stimulée le flambée oxydative chez *O. mykiss*. D'autre part, des études plus récentes chez les ormeaux (Macey et Coyne, 2005), les poissons (Aly et al., 2008) et les crustacés (Chiu et al., 2007; Mujeeb-Rahiman et al., 2010) montrent une meilleure survie et l'amélioration du statut immunitaire chez les animaux nourris avec un régime supplémenté en probiotiques après infection par des bactéries pathogènes par rapport aux traitements sans aliment probiotique.

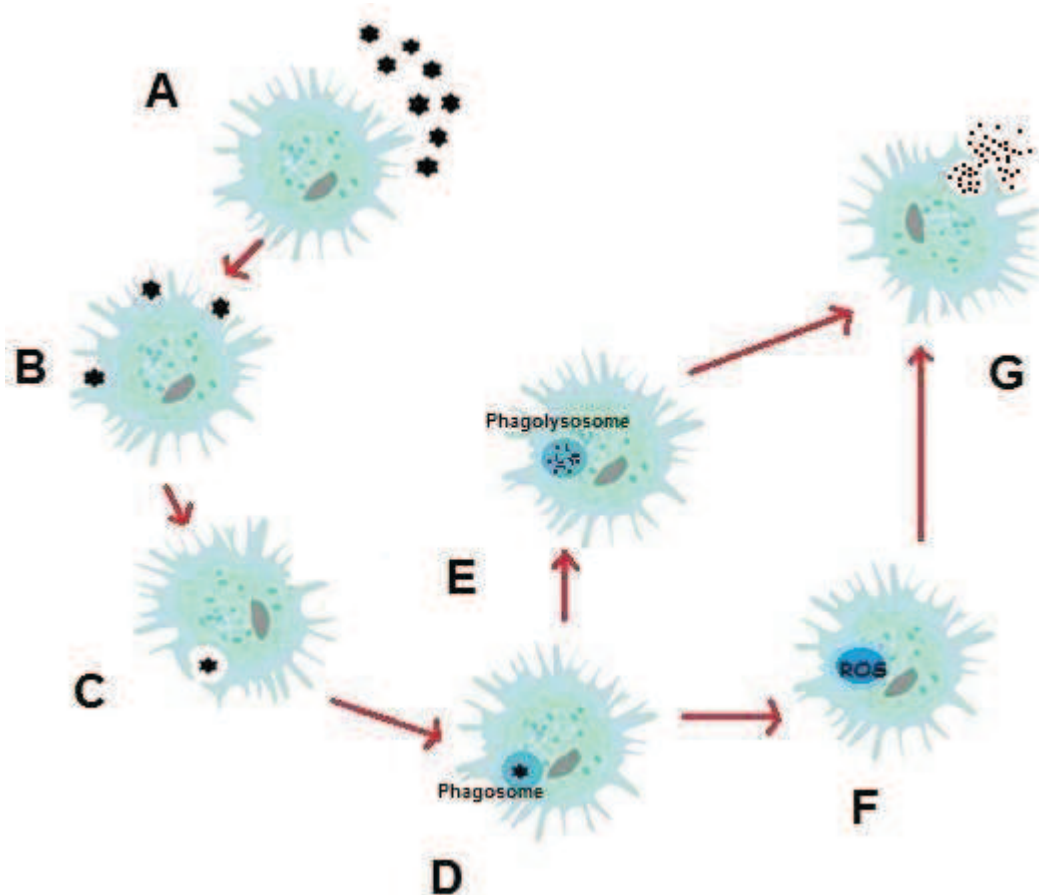
#### 4.5.5. Amélioration de la qualité de l'eau

Les probiotiques du genre *Bacillus* peuvent convertir la matière organique en CO<sub>2</sub>, contrairement aux bactéries Gram-négatives qui sont caractérisées pour convertir la matière organique en biomasse bactérienne ou limon (Dalmin et al., 2001). Laloo et al., (2007) ont testé la capacité des bactéries du genre *Bacillus* à réduire les concentrations de nitrite, nitrate et ammonium de l'eau d'élevage de poissons d'aquarium. Le même processus a également été observé par Kim et al., (2005) dans *B. subtilis*, *B. cereus* et *B. licheniformis*, qui attribuent ces effets à des mécanismes tels que la

bioaccumulation, la bio-assimilation et la nitrification. Bien que l'élimination de l'azote est une propriété prédominante chez les bactéries autotrophes, des travaux suggèrent une contribution importante de bactéries hétérotrophes dans ce domaine (Sakai et al., 1997; Kim et al., 2005; Lin et al., 2006) . En outre, l'interaction entre les bactéries probiotiques et les microalgues dans les structures d'élevage produisent généralement des effets positifs, car elles stabilisent les facteurs nutritionnels de la nourriture vivante, contribuant ainsi à la mise en place de la microflore intestinale bénéfique pour l'hôte (Reitan et al., 1993; 1997).

### **5. Généralités sur les mécanismes immunitaires des mollusques marins**

Les mollusques possèdent un système immunitaire « inné » qui contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme hôte en éliminant les composants étrangers (particules du non soi, bactéries, virus, parasites...). Les barrières anatomiques et chimiques constituent la première ligne de défense empêchant les dommages des tissus, les pertes de fluides et l'invasion par des micro-organismes. Cette première ligne de défense est principalement assurée par la coquille, le manteau, les branchies et le mucus. La seconde ligne de défense repose sur des cellules, appelées « hémocytes », capables de proliférer et de se différencier sous le contrôle de facteurs humoraux véhiculés par l'hémolymph (Sokolova, 2009). Parmi les composants de la réponse immunitaire cellulaire des mollusques, les hémocytes circulants sont responsables de l'attraction, l'infiltration, l'agrégation, l'encapsulation, des réactions intracellulaires et extracellulaires cytotoxiques et de la phagocytose des parasites, bactéries et des particules étrangères (Hooper et al., 2007; Gestal et al., 2008; Coyne, 2011) (Figure 11).



**Figure 11.** Schéma récapitulatif des mécanismes de la phagocytose chez des cellules hématocytaires de mollusque en contact avec des particules étrangères (noir). Phase d'attraction: La reconnaissance des particules étrangères se fait passivement à travers des rencontres aléatoires, ou activement par chimiotactisme (**A**); Phase d'adhésion: Cette étape se fait grâce aux lectines présentes à la surface de corps étrangers qui vont former des liaisons avec les glycoprotéines membranaires des cellules immunitaires. L'adhésion est aussi facilitée par l'opsonisation des corps étrangers (**B**); Phase d'ingestion: Formation de pseudopodes qui entourent la particule phagocytée créant ainsi une nouvelle vacuole intracellulaire: le phagosome (**C-D**); Phase de digestion: *Fusion avec les lysosomes* (**E**): Formation du phagolysosome et digestion de la particule étrangère par les enzymes lysosomiales; *Destruction du pathogène par flambée oxydative* (**F**): Production d'espèces réactives de l'oxygène (**ROS**:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl...$ ) suit à l'activation de la NADPH oxydase membranaire par l'adhésion du pathogène ; Phase d'élimination: Les débris issus de la digestion de la particule étrangère sont rejetés dans l'hémolymphe par exocytose (**G**).

Les substances solubles présentes dans l'hémolymphe jouent un rôle important dans l'immunité innée, indirectement à travers la régulation de certains mécanismes cellulaires, et

directement à travers leurs activités antimicrobiennes diverses (Bachère et al., 2004). Les mécanismes les plus importants mis en place en particulier chez les mollusques concernent:

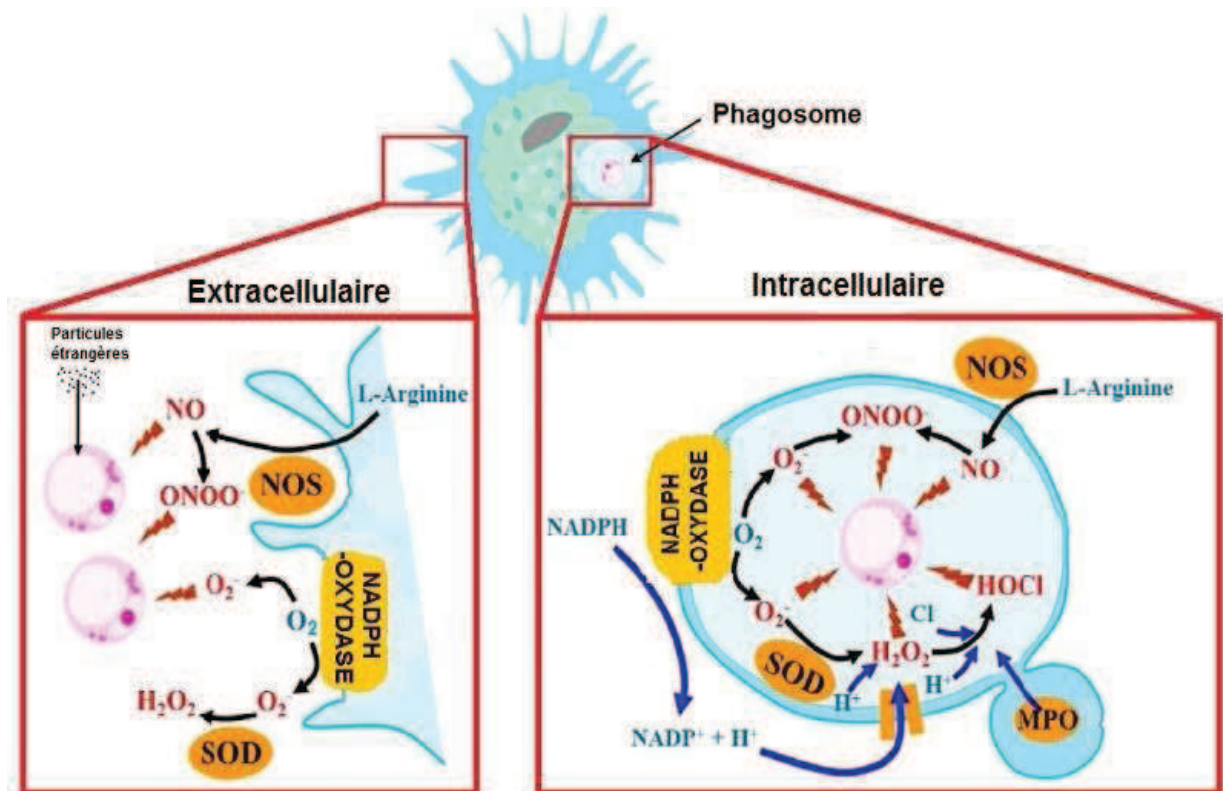
- **La cascade phénoloxydase** elle joue un rôle crucial dans l'immunité innée en faisant intervenir une enzyme cuivre-dépendante détectée dans les hémocytes et l'hémolymph (Muñoz et al., 2006; Bryan-Walker et al., 2007). La phénoloxydase catalyse la réaction de conversion de phénols en quinones, molécules extrêmement réactives. Ces molécules peuvent à leur tour être polymérisées en mélanine produisant différents intermédiaires à propriétés bactéricides (Söderhäll et al., 1996). Ces processus de mélanisation sont impliqués dans l'encapsulation et l'élimination de nombreux parasites (Bryan-Walker et al., 2007).
- **L'oxyde nitrique synthétase** qui constitue une voie concomitante ou alternative à la phagocytose pour l'élimination des organismes pathogènes (Ottaviani et al., 1993). Cette enzyme est présente dans les hémocytes et catalyse la production d'oxyde nitrique (NO) à partir de la L-arginine en utilisant le NADPH comme cofacteur. Les oxydes nitriques sont des molécules réactives qui interviennent dans la régulation des systèmes nerveux, cardiovasculaire et immunitaire, et sont utilisées en tant qu'agents antibactériens chez les mollusques (Franchini et al., 1995).
- **Les lectines** qui sont des glycoprotéines dépourvues d'activité enzymatique se liant spécifiquement et de façon réversible à une ose ou oligoside. Ces protéines participent principalement à l'opsonisation des particules étrangères, du fait de leur spécificité pour certains sucres (mannose, fructose) présents à la surface des agents pathogènes (virus, bactéries, champignons et parasites) (Pipe, 1990), mais aussi aux processus d'agrégation hémocytaire et d'agglutination des particules étrangères, ce qui conduit à leur lyse *via* les mécanismes de phagocytose.

- D'autres composants de la défense immunitaire humorale des mollusques comprennent des enzymes lysosomales (par exemple, la  $\beta$ -glucuronidase, la phosphatase acide et alcaline, la lipase, l'aminopeptidase et le lysozyme qui permet la formation de la phagolysosome) et des peptides antimicrobiens qui aident à la reconnaissance des pathogènes et des parasites les «marquant » pour la destruction par opsonisation ou par élimination directe (Tiscar & Mosca, 2004; Gestal et al., 2008; Vasta & Ahmed, 2008; Sokolova, 2009; Donaghy et al., 2010). Les agglutinines FREPS (Fibrinoge-related proteins) et autres lectines, avec les récepteurs PRRs (patterns recognition receptors) qui reconnaissent les PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns), sont responsables du degré de spécificité du système immunitaire inné face aux pathogènes et aux parasites chez les mollusques. (Aderem & Ulevitch, 2000; Paul, 2003; Yeretssian et al., 2008).

Les micro-organismes pathogènes ingérés sont neutralisés par l'action oxydante (flambée oxydative) des hémocytes qui génèrent des ROS et endommagent les composants macromoléculaires des pathogènes (Sokolova, 2009; Donaghy et al., 2010; Coyne, 2011). La flambée oxydative est catalysée par le complexe multiprotéique appelé NADPH-oxydase, qui est capable de transférer des électrons à partir de la NADPH à l'oxygène moléculaire. Le contact entre les hémocytes avec une particule non-soi produit certaines perturbations dans les composants de la membrane cellulaire qui fait que les systèmes NADPH-oxydase soient assemblés pour former un complexe enzymatique fonctionnel actif. Cette enzyme va catalyser la transformation de l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) en l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ). L'anion superoxyde peut être immédiatement dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), sous l'action du superoxyde dismutase (SOD). Ce dernier métabolite peut donner naissance à d'autres ROS comme les radicaux hydroxyles ( $OH^-$ ) ou de l'oxygène singulet ( $^1O_2^-$ ), et peut être converti en hypochlorite (HOCl) sous l'action de la myéloperoxydase (MPO) ou être réduit en  $H_2O$  et  $O_2$  sous l'action de la catalase (CAT). Ces intermédiaires réactifs de l'oxygène sont des molécules

ayant des propriétés bactéricides et virucides, qui peuvent interagir avec les enzymes hydrolytiques qui sont libérés dans le processus de phagocytose (Tiscar & Mosca, 2004; Buggé et al., 2007; Terahara & Takahashi, 2008) (Figure 12).

D'autre part, la plupart des organismes sont capables de produire de petites quantités d'oxyde nitrique (NO) à partir de l'acide aminé arginine. Dans cette réaction catalysée par l'oxyde nitrique synthase (NOS) génère un intermédiaire instable qui est la NG-hydroxiarginine, ce qui donne lieu à deux produits finaux : la citrulline et le NO (Nathan & Xie, 1994). Cependant, le NO est un gaz instable qui se transforme rapidement en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), qui sont des produits stables de la réaction. Il y a trois isoformes de NOS, deux d'entre elles sont considérées comme constitutives et dépendantes du calcium (cNOS): L'endothéliale et la neuronale, qui synthétisent NO en conditions basales. Le tiers d'entre elles est inductible et indépendant du calcium (iNOS) et ne s'exprime pas ou très faiblement dans certaines conditions physiologiques (Förstermann et al., 1991). Parmi les ROS générées après le processus de flambée respiratoire se trouve l' $\text{O}_2^-$  tel que décrit dans le paragraphe précédent. Ce radical présente une puissante activité bactéricide, mais peut également se combiner avec l'oxyde nitrique (NO) pour produire le peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), un radical d'azote avec une activité oxydante élevée ainsi qu'une activité cytotoxique (Rosen et al., 1995) (Figure 12).



**Figure 12.** Représentation schématique des mécanismes moléculaires intracellulaires et extracellulaires qui expliquent la flamée oxydative dans les hémocytes de mollusques. L'extérieur de la membrane cellulaire (à gauche) et l'intérieur de la vacuole phagocytaire (à droite). NO, Oxyde nitrique;  $\text{ONOO}^-$ , Peroxynitrite;  $\text{O}_2^-$ , Superoxyde;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Peroxyde d'hydrogène; HOCl, Hypochlorite; NOS, Oxyde nitrique synthase; SOD, Superoxyde dismutase, MPO, Myéloperoxydase. (Adapté de Donaghy et al., 2012).

Les mollusques également modulent les réponses immunitaires en présence de métaux traces tel que le cuivre. Différents travaux sont disponibles sur l'effet du cuivre dans la fonctionnalité hémocytaire des bivalves. Les travaux sur *Crassostrea virginica* (Cheng, 1988<sub>a</sub>) et *Crassostrea madrasensis* (Ittoop et al., 2009) nous informent que différentes concentrations en cuivre diminuent le nombre des hémocytes circulants totaux (HCTs). Par ailleurs, des modifications ont été décrites sur le nombre de HCT chez *Haliotis diversicolor supertexta* exposés à divers xénobiotiques entraînant une diminution des hémocytes circulants chez les animaux (Gopalakrishnan et al., 2009; 2011). La diminution de HCT dose-dépendante au cuivre peut s'expliquer par les mortalités différentielles



d'hémocytes, ou bien par la migration cellulaire dans des zones de tissu hémolymphatique sujettes aux dommages par le cuivre et autres facteurs de stress (Cheng, 1988<sub>a</sub>; Hannan et al., 2009; Gopalakrishnan et al., 2009; 2011).

L'effet de métaux traces dans la phagocytose des mollusques dépendent des espèces (Sauvé et al., 2002), du métal, de la concentration et du temps d'exposition (Cheng & Sullivan, 1984; Cheng, 1988<sub>b</sub>; Brousseau et al., 2000; Matozzo et al., 2001; Thiagarajan et al., 2006; Ittoop et al., 2009). Divers travaux signalent que l'activité phagocytaire des hémocytes d'ormeaux et d'autres mollusques bivalves diminue en présence de xénobiotiques (Cheng 1988<sub>b</sub>, Matozzo et al., 2001, Thiagarajan et al., 2006; Ittoop et al., 2009 Gopalakrishnan et al., 2009; 2011; Zhou et al., 2010). Cette diminution serait due à l'altération des composants du cytosquelette et à la production de radicaux d'oxygènes par ces xénobiotiques (Mendikute-Gomez et al., 2002).

Les modifications du cytosquelette et la forme des pseudopodes des hémocytes par l'activation de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, permettent de réduire l'activité phagocytaire du fait de la réduction de la capacité des cellules à s'adhérer au substrat et à interagir avec des particules étrangères (Matozzo et al., 2001; Zhou et al., 2010). De telles modifications peuvent être faites directement par les métaux liés avec les protéines structurales du cytosquelette, suivies par une dénaturation et indirectement par les altérations dans les mécanismes de l'homéostasie du calcium ou de l'oxydation des groupes SH des protéines du cytosquelette induite par les ROS (Matozzo et al., 2001).

Il est connu que le cuivre a une forte affinité pour les groupes SH des protéines, y compris  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Viarengo & Nicotera, 1991). L'interaction des métaux traces avec les groupes SH de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase provoque l'inactivation de l'enzyme augmentant ainsi les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Viarengo et al., 1996), à l'origine des perturbations dans l'organisation du cytosquelette et ainsi compromettre la fonctionnalité cellulaire comme : l'adhérence, la mobilité et l'activité phagocytaire (Cima et al., 1998).

Ce métal est impliqué aussi dans l'augmentation de l'activité de l'enzyme phénoloxydase (PO) des cellules hématocytaires de mollusques en conditions de dose et temps-dépendante. Ceci suggère que la toxicité du cuivre produit des effets sur l'activité de l'immunité humorale dans la période de temps d'exposition à ce métal trace. Des résultats dans le mêmes sens ont été trouvés chez *H. diversicolor* en présence de nitrite (Cheng et al. 2004<sub>e</sub>). Une augmentation de PO par l'exposition au cuivre et aux xénobiotiques organiques a été bien établie chez différentes espèces de mollusques (Coles et al., 1994<sub>b</sub>; Thiagarajan et al., 2006). Nappi et al., (1995) indiquent que ce type de stress est à l'origine des molécules intermédiaires produites par la PO et pourrait générer l'anion superoxyde. En conséquence, il est probable que les niveaux d'exposition aux métaux traces augmenteraient indirectement les radicaux libres qui peuvent causer des dommages cellulaires (Thiagarajan et al., 2006).

## 6. Généralités sur l'expression génique chez l'orveau *H. rufescens*

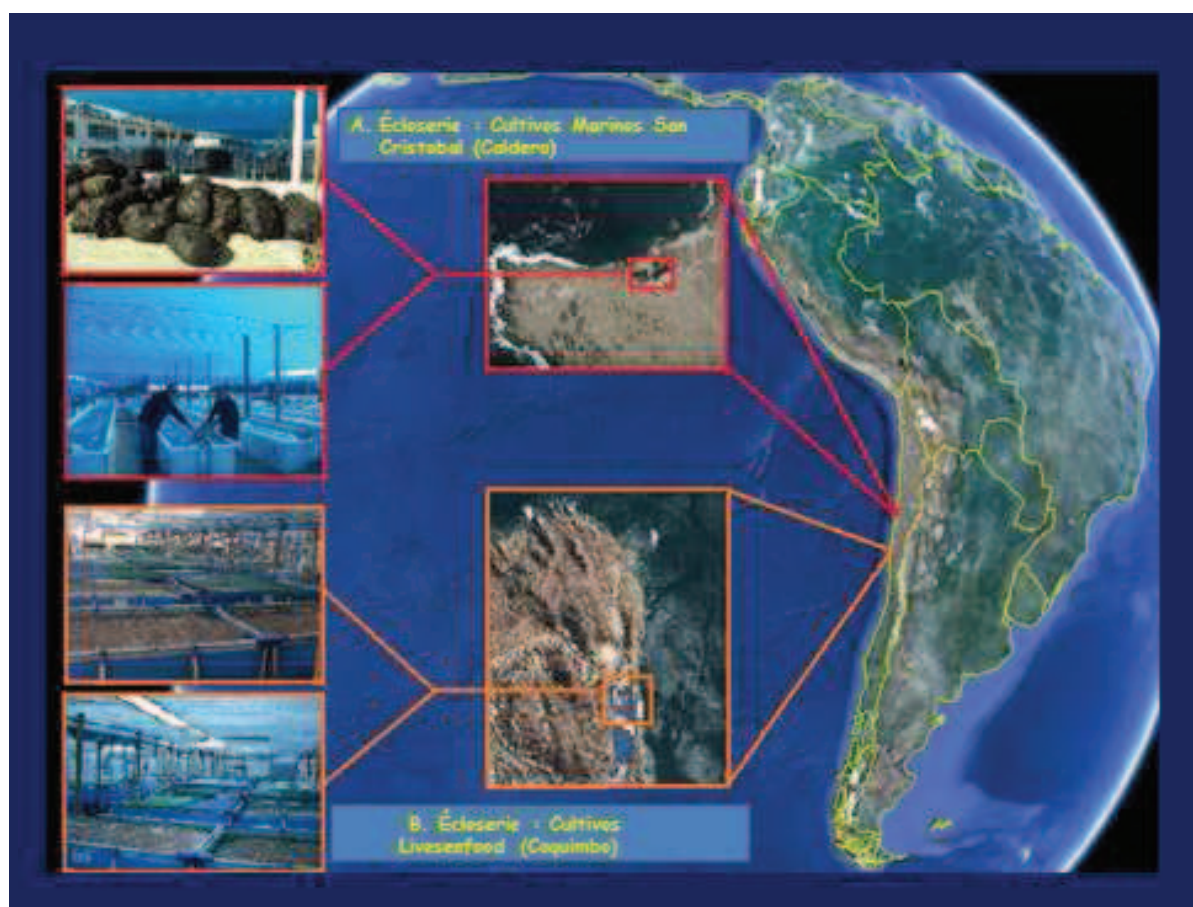
Les études génomiques disponibles sur l'orveau rouge sur le multi stress sont encore limitées. Ainsi, certains travaux montrent l'effet mono-stress de certains paramètres de l'environnement. En effet, les travaux de Zippay & Hofmann (2010) ont démontrés l'effet délétère de l'acidification des océans sur le développement des larves d'invertébrés marins. Cependant, des expériences réalisées au laboratoire ont montrées qu'une baisse de pH n'a pas d'effet sur l'expression de deux gènes impliqués dans la formation de la coquille à différents stades du développement larvaire de *H. rufescens*. Plus récemment, Wit & Palumbi (2012) ont étudié le polymorphisme du transcriptome complet de trois groupes d'orveaux adultes provenant de différentes zones géographiques de la côte Californienne. Le séquençage du transcriptome par la technique « ILLUMINA » montre une faible diversité et différenciation génétique entre ces trois populations provenant des zones géographiquement différentes.

Il s'avère donc nécessaire de développer les études sur la sensibilité et la résistance de ce mollusque *Haliotis rufescens* face aux stress multiples, afin d'explorer les mécanismes de réponses transcriptomiques et cellulaires au stress, en particulier dans la période critique de l'ontogenèse de cette espèce où des mortalités importantes sont observées. L'effet de l'impact métallique, pathogène et probiotique sera évalué en termes de survie, croissance et maintien de juvéniles permettant d'intégrer les interactions qui en découlent, de manière à améliorer la compréhension des régulations des fonctions physiologiques de cette espèce en conditions de stress.

**Chapitre I : Effet des probiotiques sur la survie  
et la croissance chez les juvéniles de l'ormeau rouge  
*H. rufescens* cultivés en éclosérie industrielle.**

## Contexte de l'étude

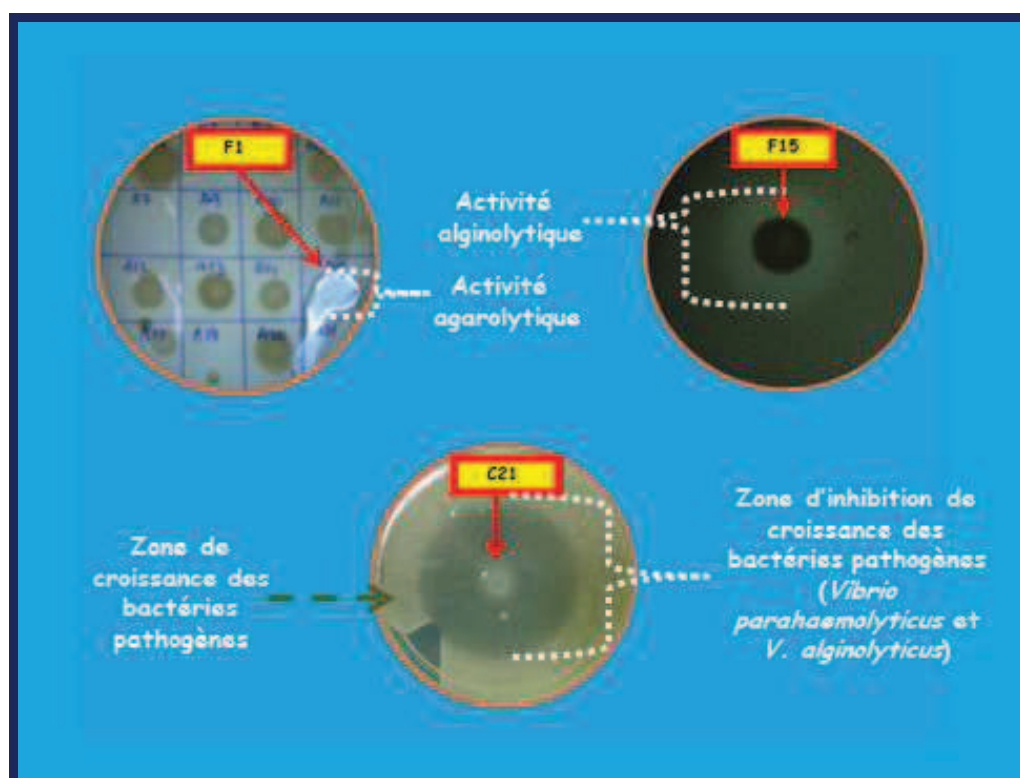
Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet d'un consortium bactérien formé d'un mélange de trois bactéries probiotiques : *Vibrio* sp C21, *Agarivorans albus* F1 et *Vibrio* sp F15 sur la survie et la croissance des juvéniles d'*Haliotis rufescens* dans deux écloséries industrielles au Nord du Chili (Figure 13).



**Figure 13.** Image sur la localisation des écloséries : A « Cultivos Marinos San Cristobal à Caldera » ; B. « Cultivos LiveSeafood à Coquimbo », Chili (Source Google Earth).

L'étude a été réalisée pendant la phase ontogénique où ces mollusques changent d'alimentation (de microalgues à macroalgues) en particulier durant la période de sevrage\*, qui correspond à une étape physiologique critique de leur cycle de vie où de fortes mortalités différentielles sont observées

chez les juvéniles sevrés (Flores-Aguilar et al., 2007) probablement en raison du changement métabolique digestif (dépression métabolique) (Viana 2002) et la présence d'agents pathogènes opportunistes (Handler et al., 2005; Sawabe et al., 2007). Ces souches bactériennes ont été isolées et sélectionnées à partir d'études antérieures réalisées dans notre laboratoire en fonction de leur plus grande capacité à dégrader principalement l'agar et l'alginate des macroalgues (Souches *Agarivorans albus* F1 et *Vibrio* sp F15) et par leur capacité à inhiber des bactéries pathogènes telles que *Vibrio parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* (*Vibrio* sp C21) (Figure 14). (PATENT COOPERATION TREATY PCT/CL2010/000055) « Food containing macroalgae and probiotics bacteria useful for the development and survival of abalone » brevet déposé en 2010.

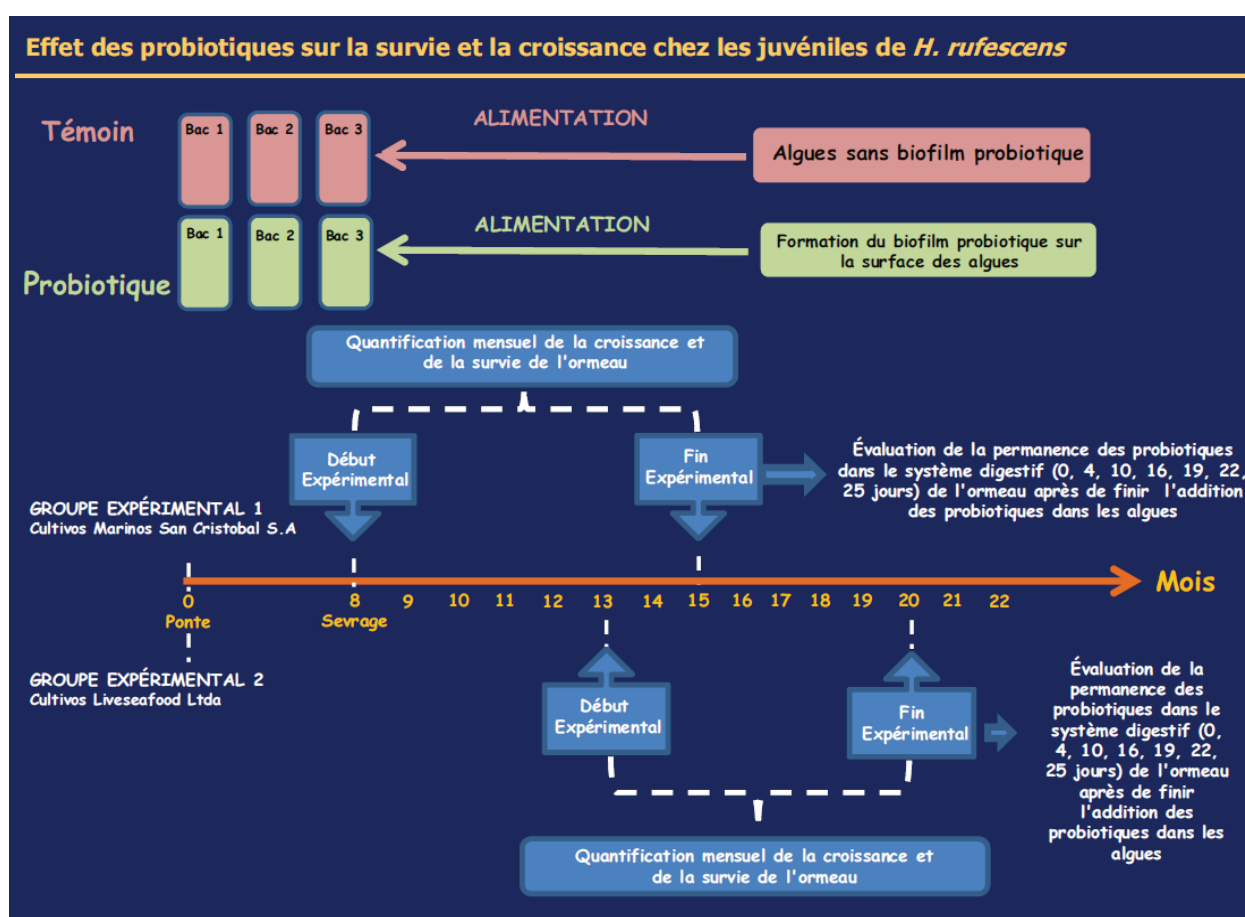


**Figure 14.** Activité exo-enzymatique et d'inhibition des bactéries probiotiques utilisées dans cette étude. Souches : *Agarivorans albus* F1 dégrade principalement l'agar ; *Vibrio* sp F15 dégrade principalement l'alginate et la souche *Vibrio* sp C21 a la capacité d'inhiber des bactéries pathogènes telles que *Vibrio parahaemolyticus* et *V. alginolyticus*.

Dans ce contexte expérimental, nous avons utilisé la macroalgue *Macrocystis integrifolia* (nourriture traditionnelle pendant la phase de croissance de *H. rufescens*). Cette algue sert de substrat

pour la formation d'un biofilm composé des souches bactériennes probiotiques pour être utilisés plus tard comme vecteur d'entrée des probiotiques dans le tractus digestif des animaux. Par la suite, pour chaque classe de taille des ormeaux, on a évalué la survie et la croissance mensuelle pour une période de 7 mois. A la fin de cette période expérimentale (7 mois de culture) on a supprimé l'addition des probiotiques et à l'aide des techniques microbiologiques nous avons quantifié les bactéries sur des milieux nutritifs solides. L'identification et la quantification des bactéries probiotiques ont pu être établies dans le tractus digestif des ormeaux expérimentaux.

L'approche expérimentale suivie est résumée dans la figure 15.



**Figure 15.** Ce schéma représente les différentes étapes expérimentales mises en place pour évaluer la survie et la croissance des jeunes ormeaux en présence de microorganismes probiotiques. Le processus expérimental 1 a été réalisé à l'écloserie San Cristobal pendant la période de 8 à 15 mois et la deuxième expérience (groupe expérimental 2) a été réalisée à l'écloserie Liveaseafood chez les Ormeaux âgés de 13 à 20 mois.



\*Sevrage : ce terme décrit la période où les jeunes gastéropodes changent leur nourriture c'est-à-dire qu'ils passent d'une alimentation de microalgues (biofilm) à une alimentation constituée de macroalgues et qui correspond au développement de leur radula.

*Les différents résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont fait l'objet d'une publication :*

***Use of macroalgae supplemented with probiotics in the *Haliotis rufescens* culture in Northern Chile. Publié dans *Aquaculture Research* 42 (2011a) pages 953-961.***



# Aquaculture Research

Aquaculture Research, 2011, 42, 953–961

doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02678.x

## Use of macroalgae supplemented with probiotics in the *Haliotis rufescens* (Swainson, 1822) culture in Northern Chile

Fernando R Silva-Aciares, Paolo O Carvajal, Cristian A Mejías &amp; Carlos E Riquelme

Unidad de Microbiología Aplicada, Centro de Bioinnovación, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile

**Correspondence:** FR Silva-Aciares, Unidad de Microbiología Aplicada, Centro de Bioinnovación, Universidad de Antofagasta, Casilla 170, Antofagasta, Chile. E-mail: fsaciares@uantof.cl

### Abstract

In this study, we evaluate the use of macroalgae as vectors of probiotics bacteria into the digestive tract of abalone to improve their survival and growth. It is shown that when abalone *Haliotis rufescens* of different sizes were fed with a natural diet composed of fronds of the macroalga *Macrocystis integrifolia* supplemented with a mixture of *Vibrio* sp. C21-UMA, *Agarivorans albus* F1-UMA and *Vibrio* sp. F15-UMA bacteria, there was a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the average monthly growth rate and survival (%) in a period of 210 days, compared with the control without a probiotic supplement. The permanence of the probiotics in the digestive tract of the animals was monitored, and it was found that the number of culturable C21-UMA and F1-UMA bacteria decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in recently weaned and adult abalone, and they almost disappeared completely on day 19 of the bioassay. However, the culturable *Vibrio* sp. F15-UMA disappeared completely from the digestive tract on day 22 of the bioassay, and these were the bacteria that remained at the highest concentration compared with the other two bacterial strains over the experimental period. It is therefore shown that it is feasible to use a probiotic mixture to improve the profitability of the *H. rufescens* culture.

**Keywords:** *Haliotis rufescens*, abalone, macroalgae, probiotics

### Introduction

Abalone is a mollusk that has a traditional market and, for many years, has held high demand as food in world markets, mainly in Asia, resulting in high

prices (Elliot 2000). Recently the abalone industry has been growing progressively (Enriquez & Villagrán 2008), leading the countries that cultivate this resource to make significant efforts to consolidate this industry with the purpose of increasing its production significantly in the future.

At present, the abalone industry in Chile is based mainly on the red or Californian abalone (*Haliotis rufescens*), with 25 companies producing it (Flores-Aguilar, Gutierrez, Ellwanger, Searcy-Bernal 2007). Abalone culture in Chile began in 1977 through the introduction of red abalone seeds from the coast of California for its experimental cultivation (Flores-Aguilar *et al.* 2007).

The main problem faced by the cultivation of this resource is its slow growth rate. Although the growth of abalone under cultivation conditions is faster compared with the natural populations, it still needs approximately 4–5 years to reach a commercial size of 80 mm (Ten Doeschate & Coyne 2008).

Because abalone is a high-value product of aquaculture that is produced in intensive growth systems, it is inevitable that bacterial colonization of these systems and animals is an uncontrollable variable. The literature shows that bacteria form biofilms, including those associated with macroalgae, which are the abalone's food. Some studies have shown that bacteria associated with the natural food of abalone or isolated from its digestive tract secrete enzymes that can aid the organism's digestion and even improve its health (Erasmus, Cook & Coyne 1997; Viana 2002; Macey & Coyne 2005, 2006), improving the survival and growth rate of cultivated abalone (Ten Doeschate & Coyne 2008).

The use of probiotics bacteria for the prevention of disease and the improvement of nutrition in aquaculture is becoming necessary due to the increased



demand for environmentally friendly aquaculture (Vine, Leukes & Kaiser 2006). Irianto and Austin (2002) defined probiotics as microbial cells or cellular component preparations that contain live and/or dead bacteria that are of benefit to the host organism's health by stimulating its immune response and improving its nutrition. The probiotics used in aquaculture range from Gram-negative bacteria such as *Vibrio* (Macey & Coyne 2005, 2006) and *Pseudomonas* (Gram, Melchiorson, Spanggaard, Huber & Nielsen 1999); *Bacillus* (Wang, Xu & Xia 2005) and lactic acid bacteria (Iehata, Inagaki, Okunishi, Nakano, Tanaka & Maeda 2009); yeasts such as *Saccharomyces* (Iara-Flores, Olvera-Novoa, Guzman-Mendez & Lopez-Madrid 2003) and *Debaryomyces* (Macey & Coyne 2005); one-celled algae such as *Tetraselmis* (Macridis, Costa & Dinis 2006); and bacteriophages (Irianto & Austin 2002). On the other hand, it has been shown that probiotics are effective in a wide range of marine species for promoting growth and improving nutrition, immunity and survival (Macey & Coyne 2005, 2006; Ten Doeschate & Coyne 2008; Prado, Montes, Romalde & Barja 2009).

One of the main challenges in the development and use of probiotics bacteria is selecting an adequate method of bacterial colonization that is effective and economically viable. So far, studies of colonization by probiotics bacteria in abalone have been performed using pellets based on macroalgae as the input vector of these bacteria into the digestive tract of the organism (Macey & Coyne 2005, 2006; Ten Doeschate & Coyne 2008; Iehata *et al.* 2009). However, there are no reports on the use of fresh macroalgae as input vectors of probiotics bacteria into the digestive tract of abalone to improve their survival and growth. All cultures in Chile use algae as the main food for growing abalone (Flores-Aguilar *et al.* 2007). The objective of this study was to evaluate the feasibility of using fresh macroalgae as a vector of three bacteria with probiotic potential (*Vibrio* sp. C21-UMA, *Vibrio* sp. F15-UMA and *Agarivorans albus* F1-UMA) for red abalone, *H. rufescens*, in two commercial hatcheries. This study represents the first report on the use of probiotics in this species and is the first to use fresh macroalgae as an input vector for these bacteria.

## Materials and methods

### Probiotic strains and culture medium

The probiotic strains used in this study, *A. albus* strain F1-UMA and *Vibrio* sp. strain F15-UMA, were

isolated from the gastrointestinal tract of *H. rufescens* and from the macroalga *Lessonia nigrescens* from a commercial culture located in Coquimbo, IV Region, Chile (Cultivos LiveSeafood Chile S.A., 29°56'S, 71°20'O), while the bacteria *Vibrio* sp. strain C21-UMA was isolated from the macroalga *L. nigrescens* obtained from a commercial culture located in Caldera, III Region, Chile (Cultivos Marinos San Cristóbal, 26°57'S, 70°48'O). Strains F1-UMA and F15-UMA of the isolated microorganisms had been selected previously because of their ability to degrade carbohydrates, proteins and lipids, while strain C21-UMA was chosen for its ability to inhibit the growth of the pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* and its alginolytic activity (E. R. Silva-Aciares, C. A. Infante, Y. A. Luza, M. O. Rivas, & C. E. Riquelme, unpubl. data, 2010).

The three bacterial strains were cultivated in tryptone soy broth (TSB oxoid) culture medium supplemented with 0.1% (w/v) sodium alginate, 0.05% (w/v) of bacteriological agar and 2% NaCl (w/v), and they were kept in tryptone soy agar (TSA oxoid) supplemented with 2% NaCl (w/v) at a temperature of 20 °C. The appearance of clearness around the colonies cultured in TSA with 1.5% sodium alginate was indicative of alginolytic activity (C21-UMA and F15-UMA) (Hisano, Nishimura, Yamashita, Imanaka, Muramatsu, Kimura & Murata 1994). For agarolytic activity (F1-UMA), a liquefaction or softening of the agar around the colonies was observed.

Probiotic strains C21-UMA, F1-UMA and F15-UMA were identified by the amplification of 16S (E. R. Silva-Aciares, C. A. Infante, Y. A. Luza, M. O. Rivas, C. E. Riquelme, unpubl. data, 2010) and the nucleotide sequences were deposited in the GenBank database under access numbers Q861538, GQ861540 and GQ158641.

### Animals

The abalone were donated by two commercial abalone farms in Northern Chile (Cultivos Marinos San Cristóbal and Cultivos Live Seafood Chile S.A.), and they were maintained in 66 L polyethylene tanks with a continuous flow with three complete changes per hour of sea water filtered at a temperature of 16–19 °C and a continuous supply of air. The abalones were acclimated before each experiment for a period of 2 weeks, during which they were fed a diet based on *Macrocystis integrifolia* without a probiotic supplement.



### Preconditioning of macroalgae with probiotic bacteria

Fronds of *M. integrifolia* algae were selected, washed with potable water to remove epiphytic organisms and distributed in 66 L tanks containing 40 L of sea water disinfected previously with chlorine ( $0.025 \text{ g L}^{-1}$ ) and neutralized with sodium thiosulphate ( $0.075 \text{ g L}^{-1}$ ). Then a bacterial solution from TSB oxid cultures in the prestationary phase of each probiotic bacteria adjusted to obtain a final concentration of approximately  $1 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$  was added. After incubation periods of 48 h with constant aeration to obtain the bacterial colonization of the macroalgae, they were then used to feed the abalone in the experimental tanks.

To quantify the bacterial colonization, samples of these macroalgae were washed three times with sterile seawater and suspended in 3 mL of saline marine solution (SMS), removing the bacteria from the surface using an Ultrasonic Homogenizer sonicator (Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA) for 30 s and then homogenizing again in a stomacher (Lab Blender 80, Cole-Palmer) for 1 min. The resultant suspension in appropriate dilutions was then cultivated in TSA oxid plates supplemented with 2% (w/v) NaCl and supplemented with 1.5% sodium alginate and incubated for 1 week with the purpose of identifying and quantifying the characteristic morphotypes of the selected bacteria with respect to the total bacteria. The preconditioning of *M. integrifolia* was performed every 2 days at each of the abalone culture centres.

### Growth and survival tests

The study of the effect of the three potential probiotics colonized on the macroalgal diet (*M. integrifolia*) on the growth and survival of *H. rufescens* was performed in two separate experiments at the facilities of Cultivos Marinos San Cristóbal (H1) (Caldera, Chile), with abalone of an initial size of  $19 \pm 0.5 \text{ mm}$  ( $0.81 \pm 0.04 \text{ g}$ ), and Live seafood S.A (H2) (Coquimbo), with abalone of an initial size of  $36 \pm 0.4 \text{ mm}$  ( $7.0 \pm 0.32 \text{ g}$ ). In each company, six 68.48 L tanks ( $0.71 \times 0.35 \times 0.27 \text{ m}$ ) with a continuous flow of seawater filtered at a temperature of  $16\text{--}19^\circ\text{C}$  and constant aeration were used. In each tank, the abalone were distributed on two plastic mesh trays ( $0.28 \times 0.28 \times 0.18 \text{ m}$ ).

The first experiment involved recently weaned  $19 \pm 0.5 \text{ mm}$  abalone at an initial density of 120 abalone/tank (60 abalone/tray). The second experiment used adult abalone of an initial size of  $36 \pm 0.4 \text{ mm}$  and an initial density of 70 abalone/tank (35 abalone/tray).

In each experiment, three tanks with abalone fed with macroalgae without a probiotic supplement and three tanks with abalone fed with macroalgae colonized with the three probiotics bacteria were used. The animals were fed three times a week with macroalgae equivalent to 25% of their body weight. Each experiment lasted 7 months. The weight, length and survival of all animals in the experiments were measured monthly.

### Evaluation of the permanence ability of probiotics bacteria in the digestive tract of abalone

The bacterial colonization experiment was performed to determine whether the probiotic strains were capable of surviving in the digestive tract of juvenile *H. rufescens* after a period of feeding with macroalgae without bacterial preconditioning. For this, abalone from the end of the experimental stage described above were fed only with macroalgae without bacterial a probiotic supplement on days 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24. On days 0, 4, 10, 16, 19, 22 and 25, three animals from the probiotic bacterial treatment were sacrificed and bacterial colonization was evaluated. To count the probiotics in the abalone, the digestive tracts were extracted from three individuals chosen randomly. Once the homogenates were obtained, they were diluted serially in SMS tubes. Then 0.1 mL of these homogenized dilutions were spread in plates with a general culture medium for heterotrophs, Zobell 2216 marine agar (AM Difco, Franklin Lakes, NJ, USA), supplemented with 1.5% sodium alginate and incubated for 1 week in a temperature-controlled room at  $20^\circ\text{C}$ . After the incubation, selective counts of colony-forming units (CFU) and biochemical identification tests (API20E; Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France) of presumptive probiotic strain were carried out to determine the percentage of inoculated probiotics in the digestive tract. Also, these probiotics are distinguished from the other bacteria according to the characteristics of the morphotype of the (CFU) (shape, colour, edge, surface, elevation) and by their capacity to degrade alginate (Sawabe, Oda, Shiomi & Ezura 1995) and agar (Fu, Lin & Kim 2008) in the Zobell 2216 marine agar plates.

### Statistical analysis

All the results of the growth and survival bioassays expressed as the mean and deviation standard were



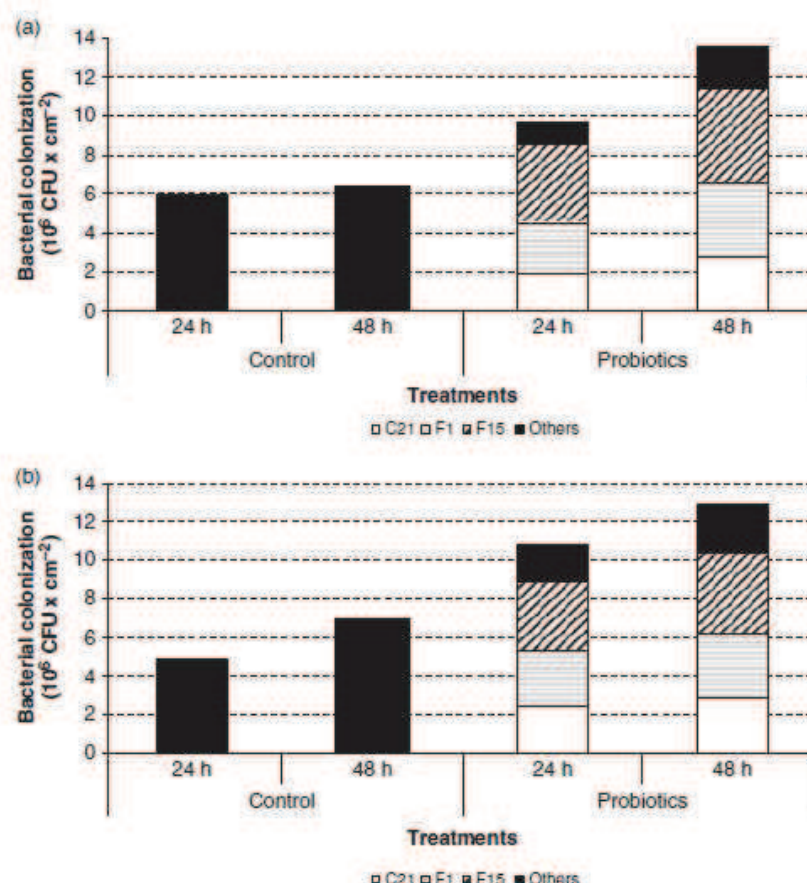
subjected to analysis of variance (ANOVA). Significant differences were set at  $P < 0.05$ . When the effects of the ANOVA were significant, determination of the factors that can cause significant differences was made by means of the LSD multiple comparison test using the STATGRAPHICS CENTURION XV Professional statistical software.

## Results

### Bacterial colonization on the surface of the *M. integrifolia*

The three strains of bacterial probiotics selected were capable of develop biofilms and colonizing the surface of *M. integrifolia* fronds. The bacterial count (CFU cm<sup>-2</sup>) of the bacteria compared with the total

heterotrophic count in the control and the treatment are shown in Fig. 1. In both hatcheries (H1 and H2), the increase in the bacterial load can be clearly seen on the fronds supplemented with probiotics after 48 h of incubation (Fig. 1a and b), and the main component of those treatments was the *Vibrio* sp. F15-UMA strain, with values of  $4.85 \pm 0.88$  ( $\times 10^6$  CFU cm<sup>-2</sup>) and  $4.24 \pm 0.78$  ( $\times 10^6$  CFU cm<sup>-2</sup>) for H1 and H2 respectively. In decreasing order of bacterial colonization, the values attained by *A. albus* F1-UMA were  $3.78 \pm 0.51$  ( $\times 10^6$  CFU cm<sup>-2</sup>) and  $3.36 \pm 0.44$  ( $\times 10^6$  CFU cm<sup>-2</sup>) for H1 and H2, respectively, and those attained by *Vibrio* sp. C21-UMA were  $2.77 \pm 0.23$  ( $\times 10^6$  CFU cm<sup>-2</sup>) and  $2.79 \pm 0.46$  ( $\times 10^6$  CFU cm<sup>-2</sup>) for H1 and H2 respectively. On the other hand, colonization with lower densities was reached by other bacteria, with



**Figure 1.** Bacterial colonization of probiotics (*Vibrio* sp. C21, *Agarivorans albus* F1 and *Vibrio* sp. F15 cells (CFU cm<sup>-2</sup>) on the macroalgae *Macrocytis integrifolia* with respect to the total number of Heterotrophics bacteria (total) at 24 and 48 h after the incorporation of selected bacteria in two commercial hatcheries. a = Cultivos San Cristobal S.A; b = Cultivos Live-seafood S.A. Control = treatment without bacterial addition. The bars represent the mean of three replicates.



values of  $2.22 \pm 0.39$  ( $\times 10^6$  CFU cm $^{-2}$ ) and  $2.53 \pm 0.59$  ( $\times 10^6$  CFU cm $^{-2}$ ) for H1 and H2 respectively. Bacterial colonization of the control reached its maximum after 48 h, with values of  $6.34 \pm 0.47$  ( $\times 10^6$  CFU cm $^{-2}$ ) and  $6.97 \pm 0.71$  ( $\times 10^6$  CFU cm $^{-2}$ ) for H1 and H2 respectively.

### Determination of probiotics' effect on the growth and survival of abalone

Table 1 shows the results of the bioassays performed in the two commercial hatcheries, showing that abalone fed with a diet of macroalgae preconditioned with mixtures of probiotics bacteria improved ( $P < 0.05$ ) their growth significantly in terms of length (mm) and weight (g) compared with the control after the 210 days of experimental time. The average monthly growth rate of recently weaned abalone ( $18.87 \pm 0.02$  mm,  $0.81 \pm 0.01$  g) fed with macroalgae preconditioned with probiotics bacteria improved significantly by 8.40% in length and 16.49% in weight compared with abalone fed with macroalgae without probiotics. Similarly, the incorporation of the mixture of probiotic bacteria into the diet of adult abalone ( $36.01$ – $36.23$  mm,  $6.99$ – $7.07$  g) improved the average monthly growth rate significantly by 9.58% in length and 15.94% in weight, respectively, compared with the control.

Recently weaned abalone fed with the probiotic diet showed significant survival compared with abalone

fed without a probiotic diet after 180 days of culture, achieving survival rates of 99.7% and 95.8%, respectively, after 210 days of cultivation. On the other hand, adult abalone fed with the probiotic diet showed significant survival compared with the controls without probiotics after 60 days of culture, achieving a survival rate of 100% and 90.48%, respectively, after 210 days of culture (Fig. 2).

### Persistence of the probiotic strains in the abalone digestive tract

The ability of probiotic bacteria to remain in the digestive tract of juvenile and adult abalone was evaluated after ending the feeding with the macroalgal diet supplemented with probiotics, which took place over a period of 210 days (Fig. 3). The number of cultivable *Vibrio* sp. C21-UMA and *A. albus* F1-UMA bacteria decreased significantly in the digestive tract of recently weaned (Fig. 3a) and adult (Fig. 3b) abalone after the fourth day of cessation of the probiotic diet, compared with day 1 of the experiment, and disappeared completely on day 19. In the case of the probiotic *Vibrio* sp. F15-UMA, the cultivable bacteria disappeared completely from the digestive tract of the abalone on day 22 of the bioassay, and these were the bacteria that remained in the highest concentration over the entire experimental period compared with the other two probiotic strains. The cultivable bacterial counts of C21-UMA, F1-UMA

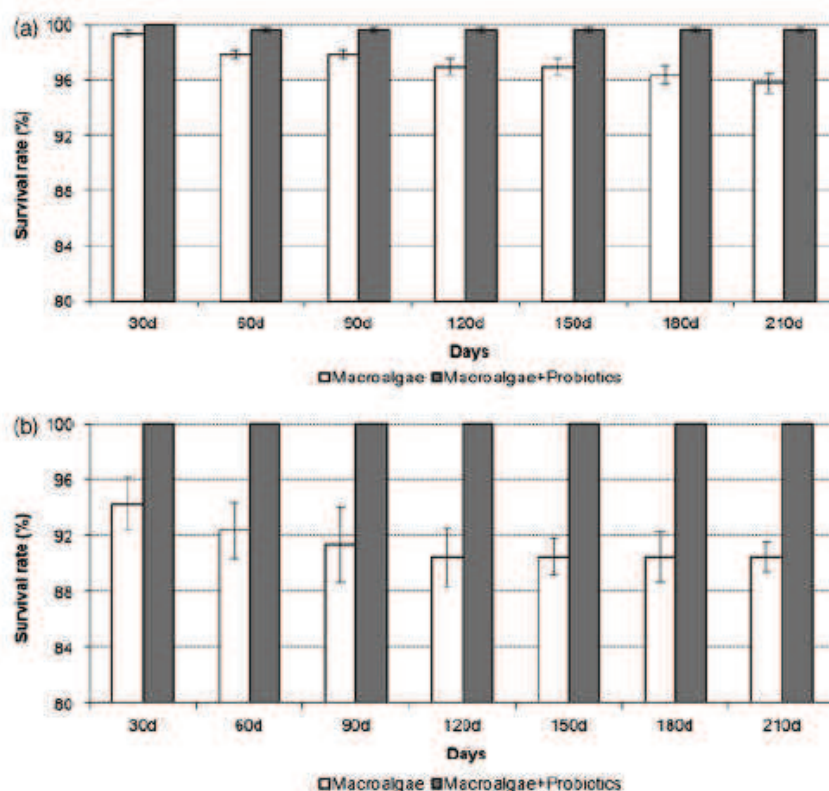
**Table 1** Monthly growth of recently weaned (H1) and adults (H2) abalone fed with a macroalgae diet (MD) and a macroalgae-probiotic diet (MPD) during 210 days of culture

Time (day)	H1				H2			
	MD		MPD		MD		MPD	
	Length (mm)	Weight (g)	Length (mm)	Weight (g)	Length (mm)	Weight (g)	Length (mm)	Weight (g)
Growth								
0	18.85 $\pm$ 0.23*	0.81 $\pm$ 0.04†	18.88 $\pm$ 0.39*	0.81 $\pm$ 0.02†	36.01 $\pm$ 0.44*	6.99 $\pm$ 0.32†	36.23 $\pm$ 0.73*	7.07 $\pm$ 0.67†
30	23.94 $\pm$ 0.31*	1.74 $\pm$ 0.08†	25.10 $\pm$ 0.12**	2.09 $\pm$ 0.04††	38.83 $\pm$ 0.73*	8.95 $\pm$ 0.35†	40.82 $\pm$ 0.82**	10.00 $\pm$ 0.86††
60	28.64 $\pm$ 0.40*	3.15 $\pm$ 0.15†	30.57 $\pm$ 0.33**	3.86 $\pm$ 0.13††	43.38 $\pm$ 0.67*	12.85 $\pm$ 1.17†	45.11 $\pm$ 0.91**	13.56 $\pm$ 0.93†
90	31.53 $\pm$ 0.44*	4.24 $\pm$ 0.17†	32.93 $\pm$ 0.53**	4.99 $\pm$ 0.22††	46.83 $\pm$ 0.73*	16.13 $\pm$ 0.84†	48.48 $\pm$ 0.90**	16.61 $\pm$ 0.92†
120	34.92 $\pm$ 0.46*	6.12 $\pm$ 0.24†	36.75 $\pm$ 0.41**	7.45 $\pm$ 0.29††	50.28 $\pm$ 0.79*	19.55 $\pm$ 1.10†	51.53 $\pm$ 0.82**	20.71 $\pm$ 1.09†
150	38.32 $\pm$ 0.41*	8.85 $\pm$ 0.64†	40.48 $\pm$ 0.36**	10.45 $\pm$ 0.42††	52.34 $\pm$ 0.66*	21.59 $\pm$ 1.22†	53.88 $\pm$ 0.65**	23.47 $\pm$ 1.56††
180	40.75 $\pm$ 0.35*	10.37 $\pm$ 0.42†	42.57 $\pm$ 0.22**	12.44 $\pm$ 0.22††	53.44 $\pm$ 0.62*	24.51 $\pm$ 0.96†	55.09 $\pm$ 1.75*	25.77 $\pm$ 1.36†
210	42.86 $\pm$ 0.34*	12.09 $\pm$ 0.34†	44.72 $\pm$ 0.23**	14.48 $\pm$ 0.29††	55.35 $\pm$ 0.90*	27.30 $\pm$ 1.51†	58.15 $\pm$ 0.64**	31.21 $\pm$ 1.37††
Monthly growth rate								
210	3.40 $\pm$ 0.38*	1.63 $\pm$ 0.24†	3.70 $\pm$ 0.41**	1.95 $\pm$ 0.20††	2.83 $\pm$ 0.26*	2.90 $\pm$ 0.15†	3.13 $\pm$ 0.31**	3.45 $\pm$ 0.13††

Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation.

Different numbers of (\*) and (†) indicate that there is a significant difference (analysis of variance, test LSD,  $P \leq 0.05$ ) between data obtained from abalone fed with a macroalgae diet and a macroalgae-probiotic diet.





**Figure 2.** Effect of a mix of probiotic bacteria (*Vibrio* sp. C21, *Agarivorans albus* F1 and *Vibrio* sp. F15) on the Survival rate % of *Haliotis rufescens* at 210 days fed with (■) or without a probiotic-supplemented diet (□) in two commercial hatcheries. a = Cultivos San Cristobal S.A.; b = Cultivos Live seafood S.A. The bars represent the mean of three replicates. Vertical lines represent the Standard Deviation.

and F15-UMA in the digestive tract of recently weaned abalone (Fig. 3a) were 0, 0 and  $0.21 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>, respectively, and 0, 0 and  $0.05 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>, respectively, in adult abalone on day 19 of the experiment (Fig. 3b).

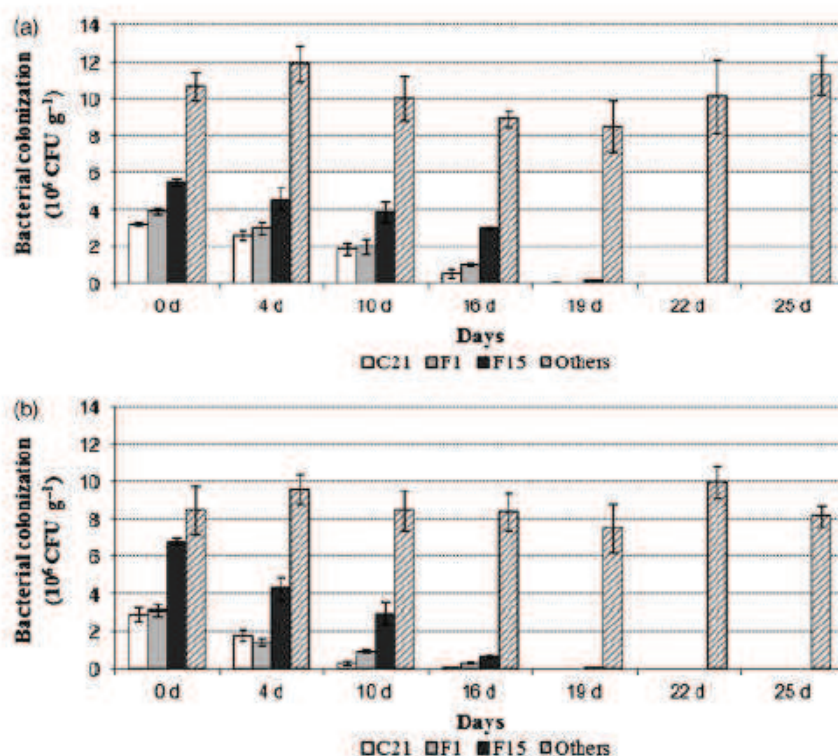
## Discussion

The three probiotic strains used in this study (*A. albus* F1-UMA, *Vibrio* sp. F15-UMA and *Vibrio* sp. C21-UMA) were able to form biofilms and colonize the surface of fronds of the macroalga *M. integrifolia*, in agreement with what was reported by Cooksey and Wigglesworth-Cooksey (1995), who stated that in marine microenvironments, the formation of a bacterial biofilm on a marine surface, including macroalgae and diatoms that serve as food for abalone (Daume 2006), is inevitable. The bacterial strains used in this study are probably adapted to adhere and form a primary bio-

film, and are favoured by the characteristics of the substrate's surface (Characklis & Bryers 1990).

As already mentioned, two of the three strains used in this study belong to the genus *Vibrio*. The *Vibrio* sp. F15-UMA strain was chosen because of its ability to degrade carbohydrates, proteins and lipids, while the *Vibrio* sp. C21-UMA strain was chosen because of its ability to inhibit the growth of the pathogenic bacteria *V. alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* (unpubl. data). There are reports that *Vibrios* are used as probiotics in aquaculture (Avenidaño, Riquelme, Escibano & Reyes 2001; Gulliam, Thompson & Rodriguez 2004; Macey & Coyne 2006). It has also been reported that there are *vibrios* that establish and maintain a positive symbiotic relation with marine organisms (Urakawa & Rivera 2006). This agrees with the results of the present study, which indicate that the bacterial supplement is acting positively in the digestive tract of cultivated organisms, improving their survival and growth rates. Some studies report that *Vibrio haloticoli* bac-





**Figure 3.** Total number (CFU g<sup>-1</sup>) of *Vibrio* sp. C21, *Agarivorans albus* F1 and *Vibrio* sp. F15 cells (CFU cm<sup>-3</sup>) reisolated from the digestive tract of *Haliotis rufescens* at 0, 4, 10, 16, 19, 22 and 25 days after being fed a selected bacteria-supplemented diet for 210 days in two commercial hatcheries. a = Cultivos San Cristobal S.A.; b = Cultivos Ljvseafod S.A. The bars represent the mean of three replicate. Vertical lines represent the standard deviation.

teria isolated from the digestive system of the abalone *Haliotis discus discus*, *Haliotis diversicolor aquatilis*, *Haliotis diversicolor diversicolor* and *Haliotis midae* ferment algal polysaccharides, producing up to 68 mM acetic and formic acids as the main fermentation products of alginate; hence, it is suggested that the abundance of *V. haliotocoli* populations in the intestine of abalone may be important for the conversion of alginate to acetic acid, which would contribute to the nutrition of the host organism (Sawabe, Setoguchi, Inoue, Tanaka, Ootsubo, Yoshimizu & Ezura 2003). On the other hand, *A. albus* F1-UMA, another one of the probiotics used in this study, is a marine bacterium capable of degrading the cell wall of brown algae (Yi & Shin 2006). Fu *et al.* (2008) point out that this strain forms deep depressions in agar plates, suggesting high agarolytic activity. Probiotics improve the intestinal balance of the organism that incorporates them into its intestinal microflora, benefiting their health and growth (Gulliam *et al.* 2004; Macey & Coyne 2005; Senok, Ismael & Botta 2005). In the case of abalone, these kinds of bacteria play an over-

all role in their nutrition because they have enzymes that hydrolyse macroalgae to simple polymers and smaller units that are rapidly assimilated by the abalone (Erasmus *et al.* 1997). Erasmus *et al.* (1997) showed in abalone that enteric bacteria produce enzymes capable of degrading agar, carragenin, laminaria and alginate, and that 70–90% of the enzyme activity was extracellular, suggesting that the bacterial enzymes are secreted in the lumen of the stomach, where they can hydrolyse complex polysaccharides, showing, in different studies, the clear dependence on the polysaccharolytic, proteolytic and lipolytic activity of digestive enzymes for improving the digestibility of micro- and macroalgae (Erasmus *et al.* 1997; Sawabe *et al.* 2003; Macey & Coyne 2005; Daume 2006; Ten Doeschate & Coyne 2008). On the other hand, one of these probiotics has the potential to inhibit pathogens of the genus *Vibrio* that cause the massive death of mollusks, one of the main threats to aquacultural productivity (Chythanya, Karunasagar, karunasagar 2002; Sainz-Hernandez & Maeda-Martinez 2005; Cai, Han & Wang 2006).



The present study reports for the first time a significant improvement in the monthly growth rate of recently weaned (18.85 mm – 0.81 g initial size–weight) and adult (36.01 mm – 7 g initial size–weight) *H. rufescens*, with growth rates of 8.4% and 9.6% relative to length and 16.49% and 15.94% relative to weight (g), respectively, as a result of the incorporation of fresh macroalgae with a bacterial supplement of three probiotic strains into the natural diet, compared with a control without probiotic bacteria. Similar results were obtained by Macey and Coyne (2005), who reported that *H. midae* abalone fed with a diet supplemented with a mixture of probiotics improved the growth rate in post-weaning (20 mm – 2 g initial size–weight) and adult abalone (67 mm – 63 g initial size–weight) compared with animals without a probiotic supplement. On the other hand, a study was performed by Ten Doeschate and Coyne (2008) in which they supplemented pellets of macroalgae with the probiotic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. C4 and achieved a significant improvement in the daily growth rate (length and weight) of *H. midae* abalone, compared with abalone fed without a probiotic supplement.

This is the first study to report the colonization of probiotics in the digestive tract of *H. rufescens*. The results of the incorporation of potential probiotics through prior bacterial colonization of the macroalgae as an input vector into the digestive tract of *H. rufescens* showed that the three probiotic strains yielded colonization of the order of  $10^6$  CFU g<sup>-1</sup> and was capable of persisting between 16 and 19 days in juvenile and adult abalone, respectively, after stopping the supply of the probiotic bacteria supplement in the diet. These results agree with those of Macey and Coyne (2006), who report the successful colonization of probiotics (*Vibrio midae* SY9.8, *Cryptococcus* sp. SS1 and *Debaryomyces hansenii* AY1) in the digestive tract of *H. midae* of the order of  $10^6$ – $10^7$  CFU g<sup>-1</sup>, but after a period of cessation of the probiotic bacteria supplement, they decreased significantly. On the other hand, in recent studies performed by Iehata et al. (2009) using *Lactobacillus* sp. probiotics, they reported that this bacterial strain colonized and persisted over time in the digestive tract of the abalone *H. gigantea* after this mollusk was fed for 3 weeks with a diet containing  $10^{10}$  CFU g<sup>-1</sup> of the probiotic strain.

The bacteria in the present study have great potential for application in massive cultures of *H. rufescens* of different sizes, and possibly of other abalone species, to improve the survival and growth of

these organisms, shortening the growth stage and decreasing mortality. Also, the colonization and persistence results of this study would indicate the frequency with which these probiotic bacteria can be incorporated into the diet of the abalone to gain improvements in their growth rate and survival percentage. There is no doubt that the application of these probiotics would lead to a substantial increase in the profitability of abalone culture.

### Acknowledgments

This study was financed by the Fund for Promotion of Scientific and Technological Development, of the Chilean National Science Foundation (FONDEC, CONICYT) Grant No D05110291. The authors thank the culture companies Cultivos LiveSeafood Chile S.A and Cultivos Marinos San Cristobal S.A. for their encouragement and use of their infrastructure, as well as for their collaboration throughout the experiments.

### References

- Avendaño R., Riquelme C., Escribano R. & Reyes N. (2001) Survival and growth of post *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) in English Bay, Chile: effects of the origin, distribution in the bay and bacterioplankton larval. *Revista Chilena de Historia Natural* 74, 669–679.
- Cai J., Han Y. & Wang Z. (2006) Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities. *Aquaculture* 257, 161–166.
- Characklis W.G. & Bryers J.D. (1990) Biofilms in wastewater treatment. In: *Biofilms* (ed. by W.G. Characklis & K.C. Marshall), pp. 671–696. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Chythanya R., Karunasagar I. & Karunasagar I. (2002) Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudoalteromonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208, 1–10.
- Cooksey K. & Wigglesworth-Cooksey B. (1995) Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. *Aquatic Microbial Ecology* 9, 87–96.
- Daume S. (2006) The role of bacteria and micro and macroalgae in abalone aquaculture: a review. *Journal of Shellfish Research* 25, 151–157.
- Elliot N.G. (2000) Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquaculture Research* 31, 51–59.
- Enriquez R. & Villagrán R. (2008) La experiencia del desarrollo del cultivo de abalón (*Haliotis* spp) en Chile: oportunidades y desafíos. *Revue scientifique et technique* 27, 103–112.



- Erasmus J., Cook P. & Coyne V. (1997) The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture* **155**, 377–386.
- Flores-Aguilar R., Gutierrez A., Ellwanger A. & Searcy-Bernal R. (2007) Development and current status of abalone aquaculture in Chile. *Journal of Shellfish Research* **26**, 705–711.
- Fu X., Lin H. & Kim S. (2008) Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -galactosidase, AgaA34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *Applied Microbiology & Biotechnology* **78**, 265–273.
- Gram L., Melchiorson J., Spanggaard B., Huber I. & Nielsen T. (1999) Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment for fish. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 969–973.
- Gulliam M., Thompson F. & Rodriguez J. (2004) Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **233**, 1–14.
- Hisano T., Nishimura M., Yamashita T., Imanaka T., Muramatsu T., Kimura A. & Murata K. (1994) A simple method for determination of substrate specificity of alginate lyases. *Journal of fermentation and bioengineering* **78**, 182–184.
- Iehata S., Inagaki T., Okunishi S., Nakano M., Tanaka R. & Maeda H. (2009) Colonization and probiotics effects of lactic acid bacteria in the gut of the abalone *Haliotis gigantea*. *Fisheries Science* **75**, 1285–1293.
- Irianto A. & Austin B. (2002) Probiotics in aquaculture. Review. *Journal of Fish Diseases* **25**, 633–642.
- Lara-Flores M., Olvera-Novoa M.A., Guzman-Mendez E. & Lopez-Madrid W. (2003) Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **216**, 193–201.
- Macey B. & Coyne V. (2005) Improved growth rate disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* **245**, 249–261.
- Macey B. & Coyne V. (2006) Colonization of the gastrointestinal tract of the farmed South African Abalone *Haliotis midae* by the probiotics *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Marine Biotechnology* **8**, 246–259.
- Macridis P., Costa R.A. & Dinis M.T. (2006) Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. *Aquaculture* **255**, 76–81.
- Prado S., Montes J., Romalde J. & Barja J. (2009) Inhibitory activity of *Phaeobacter* strains against aquaculture pathogenic bacteria. *International Microbiology* **12**, 107–114.
- Sainz-Hernandez J. & Maeda-Martinez A. (2005) Sources of *Vibrio* bacteria in mollusk hatcheries and control methods: a case study. *Aquaculture Research* **36**, 1611–1618.
- Sawabe T., Oda Y., Shiomi Y. & Ezura Y. (1995) Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of Sea urchins and abalones. *Microbial Ecology* **30**, 193–202.
- Sawabe T., Setoguchi N., Inoune S., Tanaka R., Ootsubo M., Yoshimizu M. & Ezura Y. (2003) Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. haliotocoli* association. *Aquaculture* **219**, 671–679.
- Senok A., Ismael A. & Botta G. (2005) Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology Infection* **11**, 958–966.
- Ten Doeschate K. & Coyne V. (2008) Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* **284**, 174–179.
- Urakawa H. & Rivera L.N. (2006) *Aquatic Environment. The Biology of Vibrios*, 12, 175–189. ASM Press, Washington, DC.
- Viana A. (2002) Advances in nutrition, digestive physiology and metabolism of abalone. In: *Advances in Aquacultural Nutrition VI. Memoirs of the VI International Symposium on Aquatic Nutrition. 3–6 September 2002* (ed. by L.E. Cruz-Suárez, D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés & N. Simoes), pp. 1–16. Cancún, Quintana Roo, Mexico.
- Vine N.G., Leukes W.D. & Kaiser H. (2006) Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Review* **30**, 404–427.
- Wang Y.B., Xu Z.R. & Xia M.S. (2005) The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries Science* **71**, 1036–1041.
- Yi K. & Shin I. (2006) Isolation of marine bacterium decomposing sea tangle (*Laminaria japonica*) to single cell detritus. *Korean Journal Food Science Technology* **38**, 237–240.

## Conclusion sur le rôle des probiotiques

Les différentes expérimentations réalisées dans cette étude ont permis une première exploration et une évaluation des effets des probiotiques sur la survie et la croissance de l'ormeau rouge. Ces résultats obtenus en conditions contrôlées, ont permis en outre de valider l'incorporation de bactéries probiotiques (*Agarivorans albus* F1, *Vibrio* sp F15 et *Vibrio* sp C21) dans le tractus digestif des animaux pendant la phase critique de leur cycle de vie. Ce processus a lieu grâce à la colonisation de ces bactéries sur la surface de la macroalgue *Macrocystis integrifolia* qui est utilisée comme un aliment traditionnel dans les écloséries des ormeaux. De plus, l'analyse microbiologique a confirmé que les probiotiques se retrouvent généralement à une concentration relativement forte par rapport au reste de la flore bactérienne après la période de conditionnement bactérien sur la surface de *M. integrifolia*.

Cette étude a démontré le rôle primordial de probiotiques sur la croissance et la survie de ces mollusques. En effet, une nourriture algale additionnée avec des microorganismes probiotiques augmente significativement ces deux paramètres de trait de vie (survie et croissance) des ormeaux dans une période de 210 jours par rapport aux individus nourris sans probiotiques.

Au cours de ce travail, nous avons également montré au travers des techniques microbiologiques de quantification des bactéries sur des milieux nutritifs solides, que les probiotiques restent dans le tractus digestif pendant une période de 16 jours sans parvenir à s'y implanter définitivement après la fin de l'addition de probiotiques comme complément alimentaire. Pour cette raison, d'autres recherches sont nécessaires pour déterminer la fréquence d'incorporation de ces bactéries probiotiques et pouvoir les maintenir d'une manière stable dans le tube digestif de l'animal. Cependant, sa présence régulière dans le tractus digestif des ormeaux pourrait influencer la microflore indigène d'autant plus que, comme nous le montrons, cette dernière serait peu diversifiée. En effet, des interactions microbiennes dans le tractus digestif pourraient être déterminantes pour la

colonisation des parois intestinales par la microflore autochtone comme cela a été décrit chez d'autres animaux aquatiques (Aubin et al., 2005). Comme nous l'avons discuté dans l'article 1, un effet de compétition-exclusion de la souche probiotique peut être supposé. Il serait néanmoins souhaitable d'approfondir le travail de caractérisation de la flore intestinale à l'aide de techniques de biologie moléculaire (métagénomique) afin de démontrer que les souches probiotiques ont bien une activité au sein du tractus intestinal et de déterminer si des probiotiques peuvent influencer durablement la flore intestinale des ormeaux.

De plus comme il a été suggéré dans l'article 1, une première hypothèse concernant l'effet des probiotiques sur la croissance et la survie des organismes reposerait sur une amélioration de l'utilisation de l'aliment par une stimulation de l'activité digestive de l'hôte et/ou par l'apport additionnel d'enzymes exogènes (amylases, protéases, lipases, alginate lyase,...) produites par le probiotique (Ten Doeschate & Coyne, 2008; Wang et al., 2008). Il serait intéressant de réaliser différentes études enzymatiques avec des probiotiques afin d'investiguer le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) il exercerait son action sur l'activité digestive de l'ormeau. Une seconde hypothèse pourrait être l'effet sur le métabolisme par (i) diminution du métabolisme d'entretien chez les animaux recevant le probiotique, et (ii) une perte de poids des animaux témoins nourris à la ration 1 % contrairement à ceux nourris à la même ration supplémentée en probiotique. Afin de tester cette hypothèse, des études comparatives du métabolisme de base et post-alimentation par des mesures de respirométrie et par la production/consommation d'ATP, pourraient être envisagées, afin de déterminer la dépense énergétique indirecte. Soulignons que, nourrir des animaux avec une nourriture additionnée de probiotiques entraînerait une baisse de la production de ROS (Espèces Réactives à l'Oxygène). Enfin, une dernière hypothèse faisant intervenir l'apport de facteurs de croissance ou de nutriments essentiels par les bactéries probiotiques devrait également être considérée. Dans ce sens, l'augmentation du coefficient net d'efficacité alimentaire qui confère une meilleure transformation de la nourriture disponible pour la survie et la croissance, semble aller dans le sens de cette hypothèse. Il

est admis que la flore intestinale serait une source supplémentaire de nutriments et pourrait fournir des vitamines, des enzymes ou encore des acides aminés essentiels. Précisons aussi qu'un effet indirect des probiotiques sur l'alimentation, le métabolisme et l'apport nutritionnel direct, *via* une modification de la flore intestinale, pourrait être envisagé. Bien que le travail sur le sujet ait été limité au cours de cette thèse, une meilleure caractérisation des actions du probiotique sur les communautés bactériennes intestinales permettrait d'apporter des éléments de réponse complémentaires.

A ce stade de notre travail, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence du probiotique dans la réponse transcriptomique des ormeaux sains et infectés par une bactérie pathogène pendant la phase physiologique critique des jeunes organismes et déterminer la sensibilité ou la tolérance de cette espèce face à ce pathogène. (Chapitre III).

**Chapitre II : Caractérisation de la réponse  
moléculaire et cellulaire chez les juvéniles de  
*Haliotis rufescens* face au cuivre en conditions  
expérimentales.**



## 1. Contexte de l'étude

Depuis une dizaine d'années, les populations d'ormeaux ont considérablement diminué à travers le monde. La surexploitation, la destruction de leurs habitats, les pollutions environnementales croissantes et les maladies menacent les populations de ces mollusques. En Californie par exemple, le stock d'ormeaux s'est effondré et la plupart des industries ont dû arrêter leurs activités (Davis et al., 1994). Ainsi, le Fish and Game Commission a dû développer un plan de gestion et de rétablissement de la ressource naturelle de l'ormeau (The Abalone Recovery & Management Plan) (DFG, 2003).

L'effondrement de la ressource naturelle a conduit à la mise en place d'une gestion maîtrisée de l'espèce dans des structures d'élevages. Depuis, l'aquaculture de l'ormeau est devenue d'utilité publique afin d'assurer un apport stable de la ressource sur les marchés économiques. En effet, par la forte valeur commerciale de l'ormeau dans les marchés internationaux (alimentation, joaillerie...), son aquaculture se développe à travers le monde et ne cesse de s'intensifier de nos jours, avec un taux d'augmentation de 50% par an depuis ces dernières années (Flores-Aguilar et al., 2007).

L'ormeau rouge, *H. rufescens*, originaire des côtes Californiennes, a été introduit au Chili en 1977. Après plusieurs années de recherche sur les conditions optimales de culture, c'est en 1992 que l'essor de l'élevage de l'ormeau a réellement débuté au Chili. En effet, ce pays détient le cinquième rang mondial des productions d'ormeaux d'élevage (Flores-Aguilar et al., 2007). Durant ces dernières années, l'ormeau rouge a été élevé dans des bassins d'eau de mer contrôlés dans les différentes écloséries au nord des côtes chiliennes. Cependant, les importants coûts financiers induits par ce système de culture ont conduit les professionnels à mettre en place des nombreuses études afin d'évaluer les coûts de production d'un élevage dans des concessions maritimes qui s'est avéré plus rentable que l'élevage sur des structures à terre.

L'halioticulture de cette espèce dans les eaux du Pacifique sud expose les organismes à de fortes pressions anthropiques qui peuvent affecter la survie et le maintien de ce mollusque. Le

développement massif des activités humaines sur la côte (industrielles, portuaires, touristiques et minières), combinée (ajoutée) à l'augmentation démographique sur les zones littorales, a intensifié considérablement les facteurs de stress dans ces régions (Lotze et al., 2006). La contamination par les métaux lourds due à l'exposition aux effluents industriels et urbains est largement reconnue pour être l'un des risques majeurs pour les organismes côtiers et la santé humaine (Salamanca et al., 2004). La contamination par le cuivre se produit principalement dans le voisinage des centres d'exploitation minières et les raffineries lors de la purification de ce métal (Riedel, 2008; Valdes et al., 2011.). Le Chili est le premier producteur de cuivre au monde et les fortes concentrations de ce métal sont à l'origine d'une source de pollution dans la zone nord du littoral chilien (Salamanca et al., 2000).

Dans le contexte actuel de l'accroissement du niveau de contaminant dans les écosystèmes marins, il est nécessaire de comprendre les réponses cellulaires, génomiques et physiologiques que les organismes mettent en œuvre pour se maintenir dans de tels milieux.

Cependant, peu d'informations sont aujourd'hui disponibles dans la littérature sur les effets d'un stress métallique, et en particulier du cuivre, sur la physiologie et la génomique de l'ormeau rouge, *H. rufescens*. Ainsi, l'objectif de la présente étude a été d'étudier la réponse cellulaire et physiologique de ces organismes face à l'impact de ce métal et d'analyser les conséquences sur la survie, le développement et la croissance des juvéniles de cette espèce.

Dans ce contexte, nos études sur cette période ontogénique des juvéniles ont été réalisées à l'aide d'indicateurs moléculaires et physiologiques, pour donner quelques éléments de réponse aux questions suivantes :

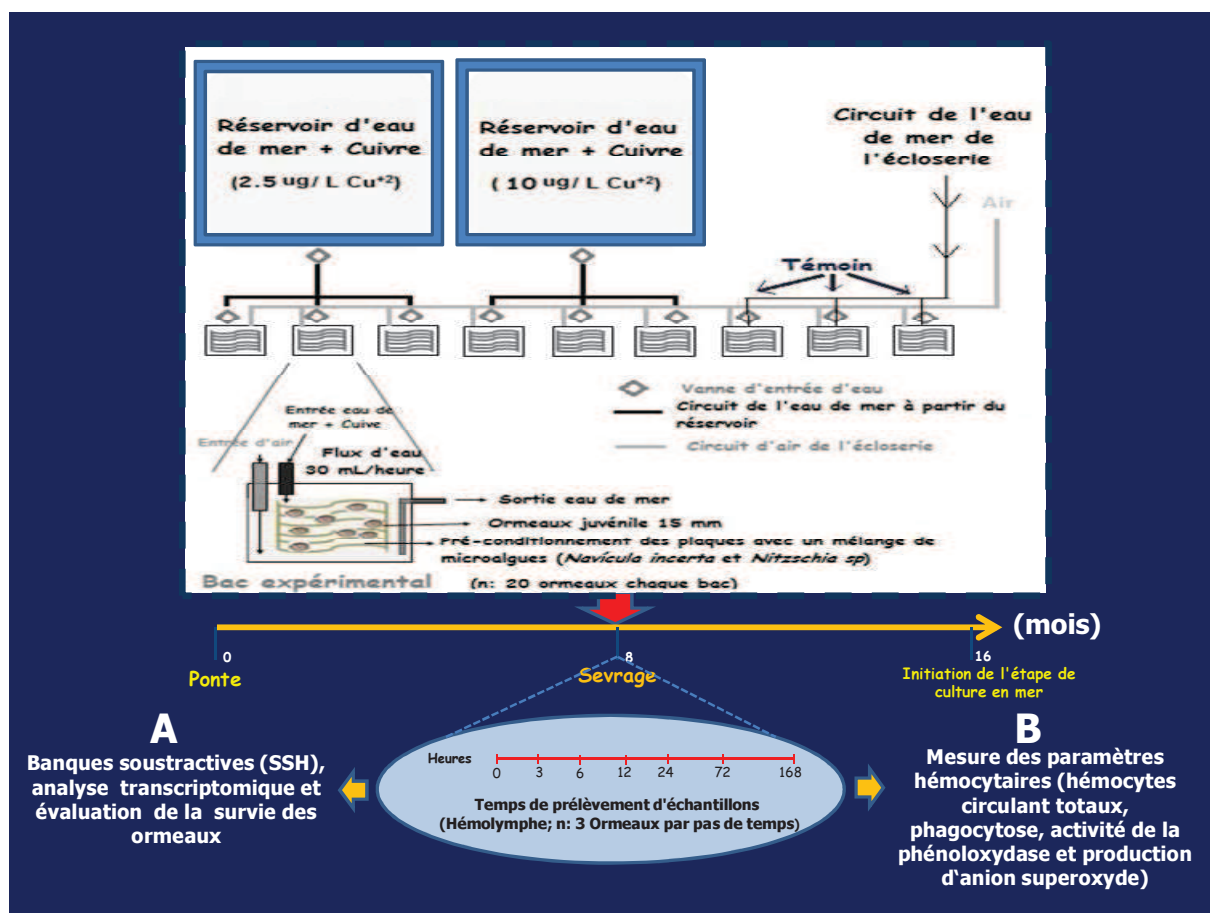
- Quelles sont les réponses transcriptomiques et cellulaires des juvéniles soumis à un stress métallique, et en particulier à des concentrations en cuivre existantes dans le milieu côtier du Nord du Chili ?

- Quel est l'impact sur la cinétique d'expression des gènes potentiellement régulés par ce métal et sur la survie des organismes?

**La première partie de ce chapitre** a été consacrée à l'étude des transcrits potentiellement régulés suite à l'action du cuivre à l'aide de la technique des banques soustractives ou "Suppressive Subtractive Hybridization" (SSH). La finalité de cette approche est l'obtention de gènes surexprimés ou inhibés entre les groupes d'individus expérimentaux et les groupes témoins. Cette technique s'intéresse à l'information génétique transcrite à partir du génome d'un organisme (ADN), et portée par les ARN messagers (ARNm). Ces molécules sont des intermédiaires dans la voie de synthèse des protéines, véritables acteurs cellulaires. Puis, l'expression de gènes révélés par SSH a été quantifiée par PCR en temps réel, afin de valider les résultats acquis et d'étudier les cinétiques de l'expression génique potentiellement régulées par effets du cuivre sur la physiologie des juvéniles.

**La seconde partie de ce chapitre** a été focalisée sur l'analyse de paramètres hématocytaires afin d'évaluer l'effet du cuivre sur les capacités de défenses immunitaires des organismes. Ces recherches ont été menées par l'analyse de la numération d'hématocytes circulant totaux, la phagocytose, l'activité de la phénoloxydase, et la production d'anion superoxyde.

Les différentes approches expérimentales appliquées dans ces deux parties sont représentées dans la figure 16.



**Figure 16.** Schéma représentant la démarche technique des travaux. (A) représente l'étape expérimentale de 0 à 168 h de stress métallique pour la construction des banques soustractives et pour évaluer la survie des animaux. (Article N°1). (B) montre l'étape expérimentale mise en place pour l'acquisition des données immunitaires. (Article N°2). Le carré central en pointillé correspond au dispositif zootechnique utilisé

Les différents résultats obtenus dans ce chapitre seront présenté par deux publications :

- A.** Identification of genes expressed in juvenile *Haliotis rufescens* in response to different copper concentrations in the north of Chile under controlled conditions (Article 2).
- B.** Effect of copper on the immunomodulatory activities of hemocytes in juveniles of the abalone *Haliotis rufescens* cultivated under hatchery conditions (Article 3).

**A. Identification des gènes exprimés chez les Ormeaux juvéniles d’*Haliotis rufescens* en réponse à différentes concentrations de cuivre en conditions contrôlées.**

**1. Généralités**

La première phase des travaux réalisés est consacrée à l'étude des marqueurs moléculaires potentiels associés à la résistance ou à la sensibilité des organismes juvéniles face à l'effet du cuivre en conditions expérimentales. Dans un premier temps, nous avons utilisé des concentrations de cuivre correspondant à la typologie de l'écosystème marin de la baie de San Jorge d'Antofagasta, au Chili qui est considérée comme une zone potentielle de culture de l'ormeau *H. rufescens*.

*Les résultats obtenus dans les différentes expériences ont fait l'objet d'un article :*

***Identification of genes expressed in juvenile Haliotis rufescens in response to different copper concentrations in the north of Chile under controlled conditions. Publié dans Marine Pollution Bulletin 62 (2011) pages 2671-2680.***





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Marine Pollution Bulletin

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/marpolbul](http://www.elsevier.com/locate/marpolbul)

# Identification of genes expressed in juvenile *Haliotis rufescens* in response to different copper concentrations in the north of Chile under controlled conditions

Fernando Silva-Aciares<sup>a,\*</sup>, Manuel Zapata<sup>b</sup>, Jennifer Tournois<sup>c</sup>, Dario Moraga<sup>c</sup>, Carlos Riquelme<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad de Antofagasta 170, Antofagasta, Chile

<sup>b</sup>Centro Investigación Científica y Tecnológica para la Minería CICITEM, Avenida José Miguel Carrera 1701 4° piso, Antofagasta, Chile

<sup>c</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Haliotis rufescens*

Copper stress

Suppression subtractive hybridization (SSH)

Gene expression

Real time PCR

## ABSTRACT

This study reports molecular markers potentially associated with resistance or sensitivity to the impact of copper in juvenile red abalone, *Haliotis rufescens*, in the north of Chile under experimental conditions. Genomic analysis was made applying subtractive hybridization libraries (SSH) to identify genes up- and down regulated during copper exposure in abalone over periods of 12 and 168 h exposed to 2.5 and 10 µg/L of Cu<sup>2+</sup>. Results obtained from the SSH library revealed 368 different sequences regulated by copper, that correspond to eight major physiological functions. The validation of these sequences obtained by SSH as well as their expression kinetics were made by PCR in real time on 14 potential genes regulated by metal stress. This study provides information for the characterization of potential genomic markers that may be used in future environmental monitoring and to investigate new mechanisms of stress to copper in this commercially important marine species.

Crown Copyright © 2011 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The abalone is a slow-growing marine herbivore gastropod mollusk that lives in rocky substrates in temperate seas associated with brown algae prairies which are its food (Viana, 2002). There are more than 100 species of the genus *Haliotis* around the world, but less than 10% of them are commercially important. Its larval development under cultivation conditions lasts approximately 4–5 days at a temperature of 16 °C. In the settling period the larvae start feeding on microalgal films, and after 8 months, when they reach a size of 20 mm, their diet is supplemented with macroalgae plantlets in the order of 10–30% of their body weight every day (Leighton, 2000). The cultivation and marketing of abalone is not devoid of problems in aspects such as: seed supply (insufficient, irregular, and not always of good quality), instability in the provision of natural food, and the high cost of artificial food. One of the critical stages is the one called “weaning,” which consists in the transition from food based on diatomaceous biofilms to macroalgae, and it is the stage that has the highest mortality, which exceeds 30–40% of the organisms (Flores-Aguilar et al., 2007). On the other hand, over the last years abalone populations have decreased considerably all over the world. Overexploitation, habitat destruction, increasing environmental pollution, and diseases

threaten the populations of these mollusks (Davis et al., 1994; DFG, 2003).

Because of the reduction of the natural populations, abalone aquaculture became public domain with the purpose of guaranteeing a stable contribution to the marketing of this mollusk. Because of the high commercial value of abalone in the international market, its aquaculture has developed around the world and continues to grow, with a 50% increase in recent years, with China holding first place in abalone production in 2006, with 5000 tons (Flores-Aguilar et al., 2007).

Of the 100 abalone species that have been identified so far, the red abalone, *Haliotis rufescens*, of Southern California, was introduced in Chile in 1977, but its cultivation started increasing only recently (Viana, 2005; Enriquez and Villagrán, 2008). In fact, it held fifth place in abalone production with 304 tons in 2006 (Flores-Aguilar et al., 2007). During the last few years the red abalone has been cultivated on land, in tanks, in hatcheries in the northern coasts of Chile. Due to the high financial costs of this cultivation system, its culture has now started in maritime concessions, especially in the south of Chile (Flores-Aguilar et al., 2007).

The introduction of abalone in the coast of the South Pacific may be subject to high anthropogenic pressure that can have an impact on the development, growth and survival of this mollusk. There is no doubt that pollution by heavy metals is one of the highest risk factors for coastal organisms because they are exposed to industrial and urban effluents from this mining region (Salamanca et al., 2004). These human activities along the coast, together with

\* Corresponding author. Tel.: +56 55 637537; fax: +56 55 637804.  
E-mail address: [fsaciares@uantof.cl](mailto:fsaciares@uantof.cl) (F. Silva-Aciares).



a demographic increase in the littoral zones, have intensified considerably the stress factors in those areas (David et al., 2005; Lotze et al., 2006). These factors can be of variable nature: abiotic, biotic, or chemical, such as hydrocarbons, pesticides, heavy metals, etc. (Boutet et al., 2004; Muir et al., 2005; Tanguy et al., 2005; Vasseur and Cossu-Leguille, 2006; Zapata et al., 2009; Sussarellu et al., 2010).

Metals are present in all compartments of the atmosphere, particularly in water, where concentrations vary depending on the elements. For example, iron, zinc, nickel and copper are found in 100 nM to 1  $\mu$ M concentrations, and others like cadmium and mercury are present in trace amounts of the order of 1 nM (Achar-Joris, 2005). This has turned them into one of the main groups of substances present in the environment whose abundance has been studied widely, either because of their toxicity or because of their anthropogenic contributions, which can exceed the natural ones (Ravera and Riccardi, 1997). It must be kept in mind that many of these trace metals participate in the biological cycles of different groups of organisms (Jickells and Burton 1988; Hunter and Ho, 1991), affecting their distribution and abundance (Kudo et al., 1996).

There is much research related to mollusk species that are affected by pollutants along the coast of the Pacific Ocean. The study of De Gregori et al. (1996) and Salamanca et al. (2004), shows a heavy metal concentration gradient in *Perumytilus purpuratus* in port activities (industrial and ore unloading) and in the production centers of mollusks of economic interest, like the *Pectinids*.

Copper is considered an essential element in different physiological functions of living organisms, but in excess, free copper at the cellular level can be potentially toxic, disturbing biological functions (Bremner, 1998). The north of Chile has the world's largest open pit copper production. The presence of high concentrations of this metal is a source of pollution in the coastal zone of the region of Antofagasta (Salamanca et al., 2000). This region also represents the largest urban concentration in the north of Chile (~260,000 inhabitants), with strong anthropogenic impacts.

In the present context of increased stress levels in marine ecosystems (pollutants), it is necessary to understand the cellular, molecular and genetic mechanisms used by the organisms to remain in those media. It is well known that these factors constitute a major source of cellular dysfunction and of survival alterations of the organisms. In that sense, copper can alter the ontogenesis of larvae, juveniles and adults of commercially important organisms (Kim et al., 2007; Zapata et al., 2009).

The effect of metallic stress caused by copper has not been sufficiently documented in the literature on this gastropod mollusk with respect to its physiology and genomics (Kim et al., 2007). It is indispensable to make the transcriptomic study of this species to establish the characteristics of resistance and sensitivity of the organisms to a preponderant factor like the impact of copper on the physiology and maintenance of individuals in impacted zones, considering that red abalone is cultivated mostly on land and its potential maritime culture zones are in the north of Chile, which presents high copper concentrations, mainly from mining activities. The objective of the present work is to study the genomic response of juvenile *H. rufescens* under controlled conditions of stress by copper in a critical period of their life cycle, which corresponds to the feeding change and is characterized by heavy juvenile mortality. To that end, genes induced or inhibited after 12 and 168 h of exposure to copper concentrations of 2.5 and 10  $\mu$ g/L during the critical period were identified using the subtractive hybridization (SSH) approach. In addition, the relative expression of genes of interest was analyzed using quantitative PCR. The results from the controlled medium will serve as the basis for the study of the resistance of these organisms before their cultivation directly in the maritime concessions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Collection of biological material

Recently "weaned" juvenile *H. rufescens* abalone (trophic regimen change) with an average weight of  $0.8 \pm 0.10$  g and average size of  $1.5 \pm 0.2$  mm were obtained from a hatchery in the north of Chile (Cultivos Marinos San Cristobal, 26° 57' S, 70° 48' W) and were kept in the company's facilities in 1000-L fiberglass-reinforced plastic tanks with a continuous flow of three changes per hour of sea water filtered through 10  $\mu$ m, at a temperature of 16–19 °C, with continuous air supply, fed with biofilms of benthic microalgae and macroalgae of the genera *Macrocystis* and *Lessonia*. Before adding the copper solution, the organisms were conditioned under controlled fasting for a period of 48 h in 65.48-L polyethylene tanks with a continuous flow of sea water filtered through 10  $\mu$ m, at a mean temperature of 18 °C and an average salinity of 35‰.

### 2.2. Preconditioning process on polycarbonate plates with benthic diatoms (biofilm) to feed the juvenile abalone

The microalgae used are the benthic diatoms *Nitzschia* sp. and *Navicula incerta*, which have been reported as food for larval and juvenile states of red abalone (Carbajal-Miranda et al., 2005; Araya et al., 2010). These diatom species adhere strongly to the artificial substrates. They were kept in axenic F/2 microalgal culture medium (Guillard and Ryther, 1962) supplemented with sodium metasilicate during 5 days in 100 mL flasks, transferred to 500 mL containers, and finally to the bioassay units. Each bioassay unit is a fiberglass-reinforced plastic container (10 × 11 × 12 cm) with a volume of 1 L in which there is a rack with four polycarbonate plates 10 × 10 cm in size.

These bioassay units were used in the same preconditioning process with diatoms, and in each of them F/2 microalgal culture medium supplemented with sodium metasilicate was added. Then the benthic diatoms were inoculated at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL. Finally they were incubated for 5 days for the microalgae to get fixed and grow in biofilms on the polycarbonate plates inside the bioassay units.

### 2.3. Copper solutions

Copper chloride,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , from Merck (Chile) was dissolved at  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations of 0.5 g and 1 g/L. Stock solutions were prepared in deionized water, filtered through 0.22  $\mu$ m membrane filters (Filterpore), and stored at 4 °C.

### 2.4. Treatment and sampling of juvenile *H. rufescens*

Once the preconditioning period on the polycarbonate plates with benthic microalgae was finished, the liquid (F/2) was removed from the bioassay units and sea water filtered through 1  $\mu$ m was introduced at a flow rate of 3 L per hour, obtained from the water circulation system of the abalone company (Cultivos Marinos San Cristobal). Then two 10-L fiberglass-reinforced plastic containers containing  $\text{Cu}^{2+}$  solutions at different concentrations supplied  $\text{Cu}^{2+}$  to the bioassay units at a flow rate of 30 mL/h. The treatment was carried out in triplicate, with a control without  $\text{Cu}^{2+}$  and two treatments with 2.5 and 10  $\mu$ g/L of  $\text{Cu}^{2+}$ , respectively.

Twenty juvenile individuals of *H. rufescens* prior to "weaning," with an average size of 1.5 cm, were immediately added to each bioassay unit, and kept for a period of 168 h. Samples were taken at 0 (only the control), 3, 12, 24, 72 and 168 h, removing from the experimental units the rack with four polycarbonate plates of



each treatment and control, and removing three individuals at each sampling time. The organisms were then dissected under sterile conditions and the soft tissue, which corresponds to the body of the abalone, the digestive tract, and digestive glands, was extracted and stored in Corning tubes with RNALater, a buffer that allows the conservation and stabilization of RNA. The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until they were subjected to genomic analysis.

## 2.5. Extraction of RNAs and synthesis of cDNA

Total RNA was extracted from the samples exposed to copper at 12 and 168 h using TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. Poly (A) + RNAm was isolated from total RNA using the PolyATtract<sup>®</sup> mRNA (Promega, Madison, WI, UTI-LISE) isolation system according to the manufacturer's instructions, converting the mRNA into complementary DNA (cDNA). The amount and quality of the mRNA were estimated by spectrophotometry on a nanoDrop (Model ND-1000) spectrophotometer.

## 2.6. Identification of copper regulated genes obtained by suppression subtractive hybridization (SSH) libraries of juvenile *H. rufescens*

Subtractive hybridization was performed using 1  $\mu\text{g}$  mRNA, in both directions, to obtain overexpressed genes (forward libraries) and inhibited genes (reverse libraries). A total of eight libraries (four forward and four reverse), were built, using the 2.5  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  treatment samples and the control without  $\text{Cu}^{2+}$ , after 12 and 168 h of exposure to the metal.

The obtaining of the first and second synthesis of the cDNA strand, cloning, bacterial transformation, and culture stages of the transformed bacteria allowed the isolation of the DNA fragments developed in the SSH as described by Zapata et al. (2009). A total of 768 clones obtained were sequenced (sequencing platform of Roscoff, Bretagne, France) using an ABI 3730 automatic capillary sequencer and the ABI BigDye Terminator v.3.1 sequencing kit. All the sequences obtained were subjected to homology search with the BLASTX ([www.ncbi.nlm.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/)) program of the NCBI (National Center for Biotechnology Information) server. The function and the biological processes associated with identified genes were sought from the information found in the <http://www.expasy.org/>, <http://www.reactome.org> and <http://www.ebi.ac.uk/interz> web sites. Alignment of the sequences was carried out with the BioEdit software to determine the number of developed genes.

## 2.7. Validation of the differential expression of genes by real time quantitative PCR (Q-PCR)

The differential expression of the genes selected from the subtractive library SSH were validated using Quantitative Real Time PCR (Q-PCR) in biological triplicate using 4.86  $\mu\text{L}$  of cDNA (1/10 dilution) in a total volume of 10  $\mu\text{L}$ , which was carried out using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

The specific primers for the quantitative PCR (Real time PCR) were edited using Primer Express<sup>®</sup> Software version 3.0 (Applied Biosystems).

Total RNA was extracted from an average of three juvenile abalones, separately (biological triplicate) exposed to 2.5  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ , 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ , and the control without  $\text{Cu}^{2+}$  for 3, 12, 24, 72 and 168 h using the TRIzol<sup>®</sup> Reagent solution (Invitrogen) according to the method described under Section 2.5. Reverse transcription was performed on 1  $\mu\text{g}$  of RNA from each sample, with a random hexamer primer (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) and RevertAid<sup>™</sup> H Minus M-MuLVRT

reverse transcriptase (Fermentas) according to the manufacturers' instructions.

The Real time PCR was carried out to analyze the profiles and the kinetics of the expression of some selected genes involved in the regulation of the general metabolism, stress proteins, cellular communication, respiratory chain, energy metabolism, immunity, ribosomal proteins of the cytoskeleton, protein regulation, development, and differentiation, which represent the main biological functions.

The sequences of the oligonucleotide primers used to amplify the specific genes of the products are shown in Table 1. All the reactions carried out using the method described by Zapata et al. (2009). Each run included a positive cDNA control (a sample of free copper in each amplification plate), a negative control (non-reverse-transcribed total RNA), and a blank control (water) for each pair of primers.

To calculate the gene expression, the threshold value of each blank ( $C_t$ ) was determined as the number of cycles at which the fluorescence rose considerably above the background fluorescence level. The efficiency of the PCR ( $E$ ) was calculated for each pair of primers by determining the slope obtained from an analysis of serial cDNA dilutions from different random experimental samples (treatment with copper and control), using the method described by Yuan et al. (2006). The efficiency was obtained from the slope of the values of  $C_t$  as a function of the dilution range of the RT-PCR products, and was calculated with the formula  $E = 10^{-1/\text{slope} - 1}$ . The results are presented here as a relative normalized expression for the reference gene (actin) using the standard  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method described by Livak and Schmittgen (2001).

In order to validate the actin gene as a good internal reference for expression studies in our study, we conducted in parallel the same analysis using the 18S ribosomal gene. We performed a new RT-PCR on the same samples with random hexamers. The result analysis showed that no significant difference was observed when expression analysis were made either with 18S or actin as

**Table 1**  
Combinations of primers used in real-time PCR expression analysis.

Genes	Primer sequences (sense and antisense)
Actin	5'-AGGTTCCTGTCGCCAGAGT-3' 5'-CCAGCAGATTCCATACCAAGA-3'
Alginase	5'-CTTTGCAACGCCGACTCA-3' 5'-AGTTGTCCGAGTGCCCTCCA-3'
ATP synthase	5'-GGCGGACTATAATTCTAACGGTTTC-3' 5'-AGCAGGTGCACGAGCACTT-3'
Calponine 2	5'-CCTGCCTTCAGCTGTTCTTCA-3' 5'-TTGGCAGAGGGCTCAGAGA-3'
Cytochrome C1	5'-TTCTGTGATGGGCTCAGGTAAC-3' 5'-AGCCCGACACAGAGCTA-3'
Cytochrome oxidase 2	5'-CGTGGTCAACCTCAAGCA-3' 5'-TTAAGCAACCGCAATCAAT-3'
Cytochrome oxidase 3	5'-TAGGCTCAGAAGAAGCAAGAA-3' 5'-GAGAGGGCAGATCCAGGA-3'
Elongation factor 1 alpha (EF1 $\alpha$ )	5'-GGAGAACAGGCTTGCCAGACT-3' 5'-AGACCGGCAAGATGACCAAA-3'
Elongation factor 2 (EF2)	5'-ATGGAGTTTGTGCGATGAGAA-3' 5'-TCGCGCTGGAGATCAAT-3'
Ferritin	5'-CAAACTCAACACATCCGAAAAT-3' 5'-TGCTTCACTTCTCGTGGAA-3'
Laminin	5'-GGCTGCTTGTCTTCTTCTTCA-3' 5'-AATGGATGTGATGGTGGATCT-3'
lH1	5'-CTTCCGTTTGTATCGACTTG-3' 5'-GGTTCGCGAGTCGTGTTTCA-3'
NADH dehydrogenase subunit 4	5'-ATGGCATTTATTGCGACTTTTCA-3' 5'-GATAGGAAGAGCCGACATCGAA-3'
Senescent protein	5'-ACCTGTCTCAGCAGGCTTAAC-3' 5'-TTCATAGCGAGCTGCTTTTIG-3'
vdg3	5'-CAGCGGCTGCGATCTCAT-3' 5'-GCATATCAATCTGCTCAGACGATCT-3'



an internal control so we presented our results according to actin as an internal reference.

### 2.8. Statistical analysis

All the results expressed as mean and standard deviation were subjected to variance analysis (ANOVA). Significant differences were set at  $P < 0.05$ . When the effects of ANOVA were significant, the determination of the factors that can contribute significant differences was made by means of the Tukey multiple comparison test using the STATGRAPHICS PLUS version 5.1 statistical software. The statistical analyses were made using the values of the real-time PCR tests obtained for each triplicate biological sample collected at each sampling time. The graphs present the average values with their respective standard deviation.

## 3. Results

### 3.1. Effect of metal stress on the survival of juvenile *H. rufescens*

The copper concentrations (2.5 and 10 g/L) chosen for the present study are not lethal, since no mortality was seen during the whole period of treatment.

### 3.2. Suppression subtractive hybridization (SSH)

The SSH libraries were made from weaned juvenile *H. rufescens* at 12 and 168 h of exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations of 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$ . Sequencing of 768 clones of the subtractive libraries allowed the identification of 354 different sequences with an  $E$ -value  $< 1 \times 10^{-5}$  corresponding to potential genes regulated by copper pollution, of which 246 clones (69.5%) did not show homology with the international databases using the BLASTX program, and 108 sequenced clones (30.5%) did show homology. Supplementary tables S1–S8 show the 354 sequences ordered according to their main physiological functions, metabolic pathway, homologous species,  $E$ -value, and access number to the GeneBank.

The results show that up-and down regulated genes during exposure to copper are associated with eight major physiological cell functions: cellular communication, development, respiratory chain, cytoskeleton, general metabolism, ribosomal proteins, stress proteins, and protein regulation (Figs. 1 and 2).

The first results, regarding copper pollution after 12 h, revealed 46 differentially regulated genes with respect to the control at all the  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations used. At 2.5  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ , 10 genes (21.7%) were inhibited and 15 genes (32.6%) were overexpressed, and at 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ , 10 of the genes (21.7%) were inhibited and 11 genes (23.9%) were overexpressed. At a  $\text{Cu}^{2+}$  concentration of 2.5  $\mu\text{g/L}$  a fast response of the organisms is seen, which is translated mostly into an overexpression of the genes implied in most of the metabolic pathways.

The genes of the major metabolic pathways, like those of stress, development, and even general metabolism are mostly up-regulated. When the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration is 10  $\mu\text{g/L}$ , the response of the individuals is relatively different from that of the organisms contaminated at 2.5  $\mu\text{g/L}$ . In fact, the percentage of genes up-and down regulated metabolic pathways are of the same order of magnitude.

After extended exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  (168 h), 62 genes are regulated with respect to the control at all the concentrations used. At 2.5  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  11 genes (17.7%) were down-regulated and 23 genes (37.1%) were up-regulated; at 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  13 genes (21%) were down-regulated and 15 genes (24.2%) were up-regulated. When the stress is extended to 168 h, more metabolic pathways were up-and down regulated in individuals treated with 2.5  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$

compared to those exposed for 12 h. The same trend is seen in individuals treated with 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ , with an increase in the number of up-and down regulated metabolic pathways (Figs. 1 and 2).

### 3.3. Validation of differential gene expression by quantitative real-time PCR

The expression kinetics of 14 transcripts of juvenile *H. rufescens* exposed to 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  was performed by real-time PCR at 3, 12, 24, 72 and 168 h of exposure.

A first response of the individuals to metal stress was observed at 3 h. This was reflected in the significant inhibition ( $P < 0.05$ ) of the expression of the candidate genes of the abalones treated with  $\text{Cu}^{2+}$  compared to the control organisms, especially those related with the metabolic pathways involved in cellular communication (LpR1), development (vdg3), energy metabolism (ATP synthase), stress proteins (laminin and ferritin), and protein regulation (elongation factor 1 alpha) (Fig. 3A, B, F–H and J). The genes involved in cellular respiration (cytochrome oxidase 2, NADH sub4, cytochrome C1, cytochrome 3), Cytoskeleton (calponin 2), stress proteins (senescent protein), protein regulation (EF2), and cellular metabolism (alginase) did not show significant differences ( $P > 0.05$ ) in the expression of those transcribed at 3 h of exposure to copper (Fig. 3C–E, I, K–M and L).

In time, the LpR1 gene involved in cellular communication is inhibited significantly until 24 h of exposure to 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ ; after 24 h at both concentrations there was no significant inhibition of gene expression ( $P > 0.05$ ) (Fig. 3A). On the other hand, gene vdg3, related to development, showed a significant inhibition of its relative expression from 3 to 24 h of exposure to 2.5  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  and up to 168 h at an exposure to 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  (Fig. 3B).

With respect to the relative expression of the genes related to the metabolic pathway of the respiratory chain, the cytochrome 1 and cytochrome 3 genes showed an expression level significantly higher at 12 h of exposure to 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ . However, cytochrome 1 reached its maximum expression values at 168 h for 2.5  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  and at 12 h for 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ . For cytochrome 3 it reached a relative expression peak at 12 and 24 h of exposure at 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ , respectively (Fig. 3L and M). In the case of the cytochrome oxidase two genes, there was a significant inhibition of the expression levels only at 12 h of exposure at 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  (Fig. 3C). The relative expression of NADH sub4 did not show significant fluctuations ( $P > 0.05$ ) during the whole period of exposure to copper, but showed maximum expression levels of mRNA at 3 and 24 h of exposure to 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ , respectively (Fig. 3D).

The gene related to the cytoskeleton, calponin 2, showed a significant inhibition of its expression level only at 24 h of exposure to 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ , (Fig. 3E).

Observing the genes that participate in the general and energy metabolism, the expression of the alginase level showed a significant inhibition at the end of the exposure time (168 h) to copper for the two tested concentrations with respect to the untreated control (Fig. 3N). On the other hand, the ATP synthase gene showed a significant low level of gene expression from 3 to 168 h under the treatment with 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  (Fig. 3F).

The evolution of the expression of the transcripts related to the stress proteins laminin and ferritin (Fig. 3G and H) showed a significant inhibition at all sampling times at the two concentrations of 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ . However, for the expression of the gene of senescent protein there was a significant inhibition only at 24 h of exposure for both metal concentrations (Fig. 3I).

The expression of the genes involved in protein regulation, mainly EF2, showed a significant inhibition with respect to the control at all sampling times for both metal concentrations



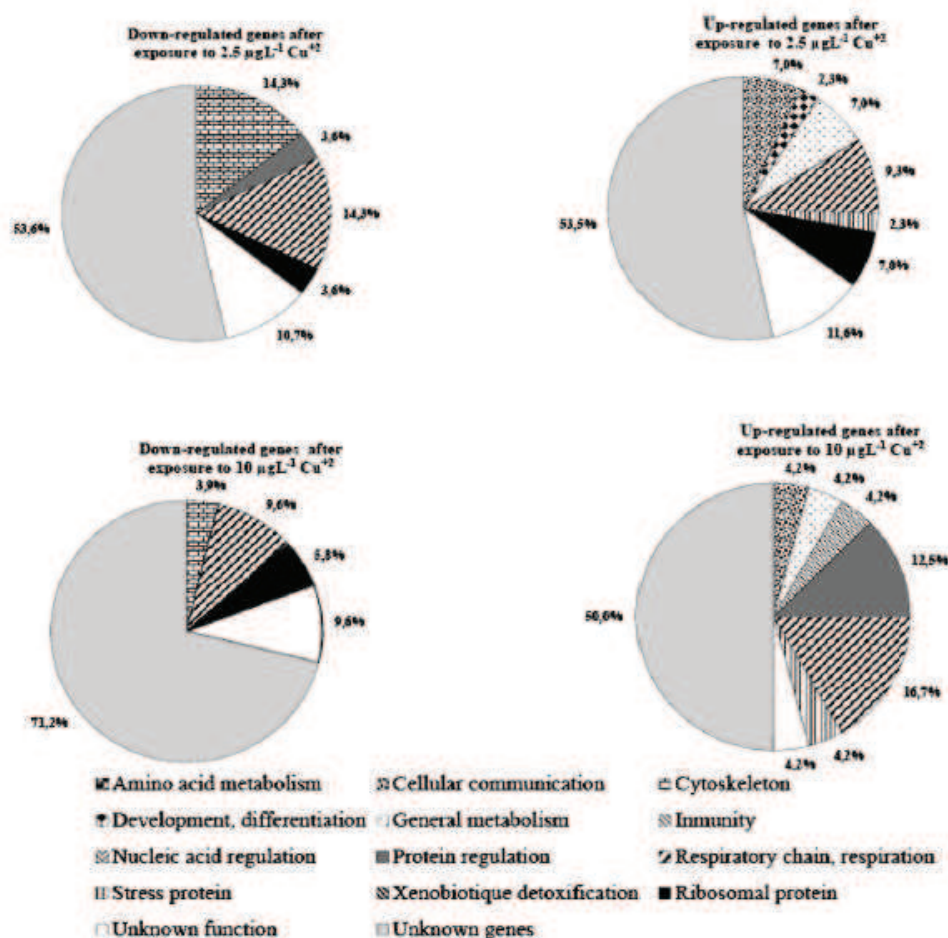


Fig. 1. Functional classification of the sequences identified in SSH libraries made from recently weaned *H. rufescens* (initial size  $1.5 \pm 0.2$  mm) after 12 h copper exposure.

(Fig. 3J). With respect to the evolution of the expression of gene *EF2*, it did not show a significant inhibition of its expression until 168 h of exposure at 2.5 and 10 µg/L Cu<sup>2+</sup> with respect to the control not treated with copper (Fig. 3K).

#### 4. Discussion

In the present study the molecular response of juvenile red abalone, *H. rufescens*, exposed to copper under experimental conditions has been determined. Using the subtractive libraries (SSH) technique to identify overexpressed and inhibited genes after exposure to two concentrations of Cu<sup>2+</sup> for a period of 168 h, 354 unique sequences were obtained, of which 108 (30.5%) correspond to known sequences, coding for the proteins potentially involved in the main cellular and physiological functions induced by copper after 12 and 168 h of exposure to 2.5 and 10 µg/L of Cu<sup>2+</sup>. In general, in mollusks exposed to different environmental stressors high percentages of unknown genes have been found (Boutet et al., 2004; David et al., 2005; Tanguy et al., 2005; Kang et al., 2006; Meistertzheim et al., 2007; Tanguy et al., 2008; Zapata et al., 2009). On the other hand, in abalone species it has been reported that the percentage of known genes is variable; for example, *Haliotis diversicolor supertexta* exposed to tributyltin (TBT) showed 45% (Jia et al., 2009), while in the same species exposed to a mixture of pathogenic bacteria it was less, with 26% of known genes (Wang et al., 2008).

Copper is an essential nutrient required for the biochemical and physiological functions of the organisms, since it is a cofactor for various enzymes (Linder, 1991). However, copper at high concentrations can also be a toxic element capable of catalyzing the formation of free radicals that cause an alteration of nucleic acids, lipids and proteins (Gutteridge and Halliwell, 2000), and it is a serious factor that affects different immune capacities and responses in aquatic animals (Yeh et al., 2004; Kim et al., 2007).

Copper concentrations in interstitial water of San Jorge Bay (Antofagasta, Chile) vary between 1.76 and 2.32 µg/L (Salamanca et al., 2004). Our results have shown that the small variations in the concentration of the metal do not affect the survival of juvenile abalone during the total exposure time. The opposite was shown by *Haliotis discus discus*, where juveniles and adults were exposed to two concentrations, 5 and 10 µM, recording mortalities higher than 50% for both states during the first 48 h, and most did not survive 72 h of exposure (Kim et al., 2007). On the other hand, a research done with the bivalve mollusk *Argopecten purpuratus* in the same study area using copper concentrations similar to those used in the present work caused a significant decrease in the percentage of post-larvae settled on a substrate under experimental conditions (Zapata et al., 2009). Other invertebrates like *Daphnia* and copepods do not show mortality until 20 µg/L (Cuéllar and Cuéllar, 2000).

In the present work a large number of genes associated with the respiratory chain affected by the copper stress were down- and up-regulated at 12 and 168 h of treatment. The gene of NADH



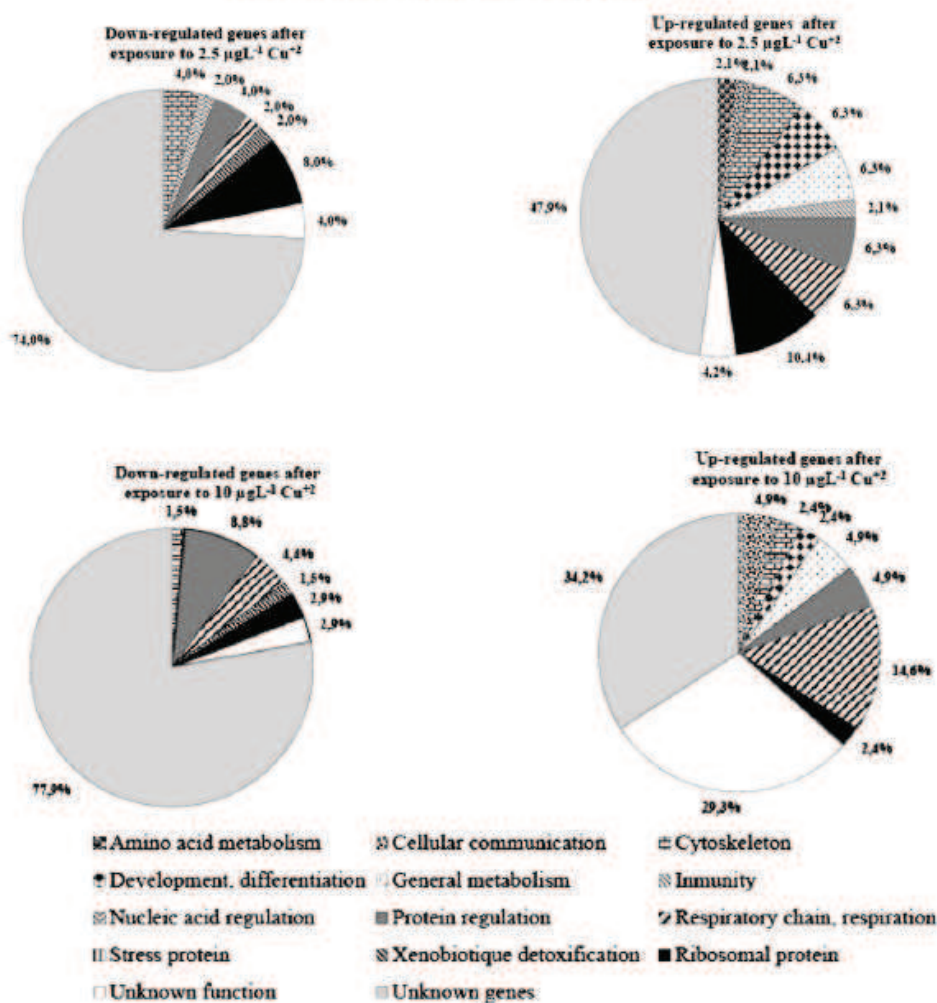


Fig. 2. Functional classification of the sequences identified in SSH libraries made from recently weaned *H. rufescens* (initial size  $1.5 \pm 0.2$  mm) after 168 h copper exposure.

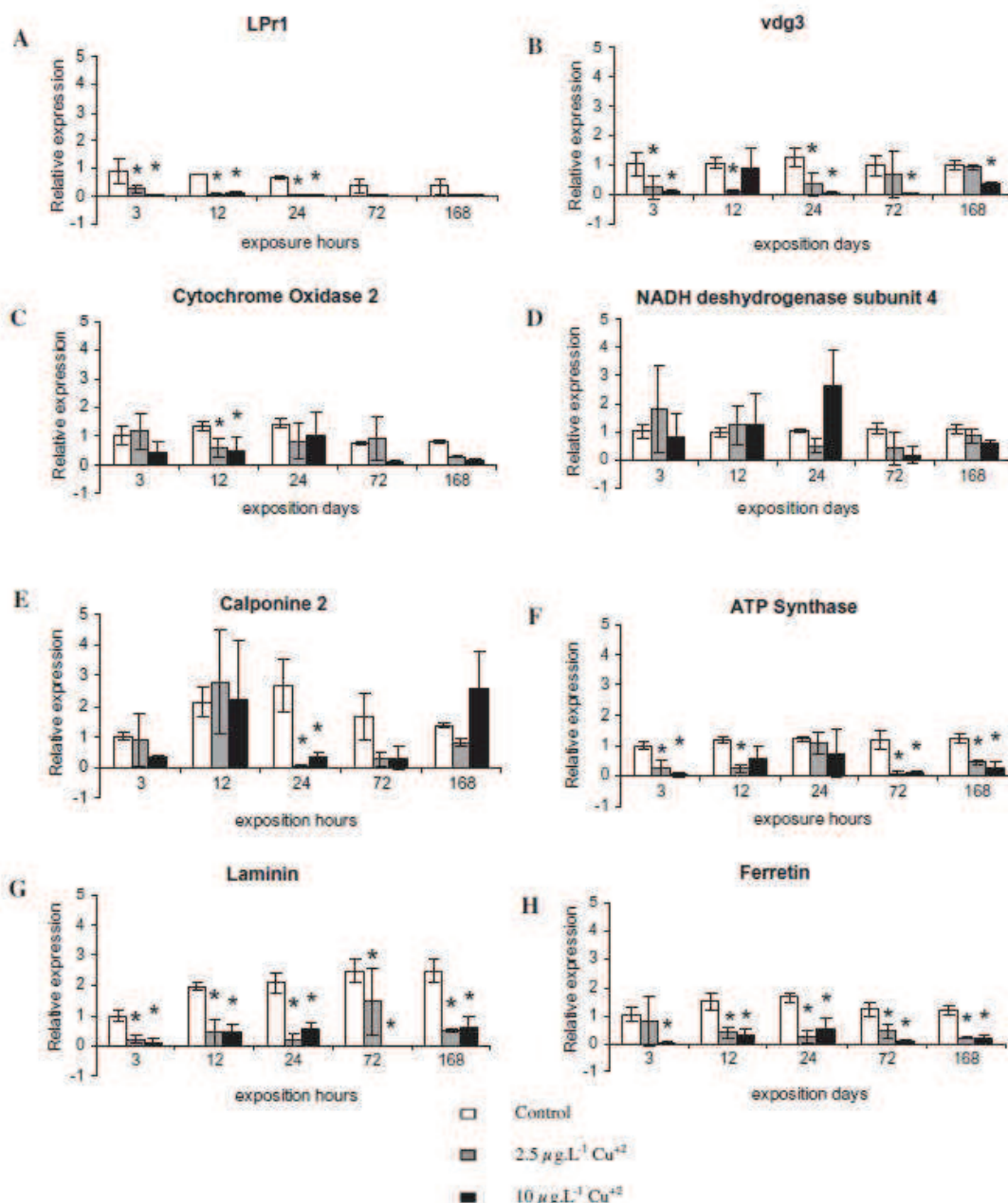
dehydrogenase subunit 4 showed a variable gene expression at the two copper concentrations used. At  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations of 2.5 µg/L there was an up-regulation of the gene, but from 24 h to 168 h it was down-regulated. In the case of the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration of 10 µg/L there was a gradual up-regulation of the gene over to 24 h of exposure, and then it was down-regulated. This variability in regulation, up- and down-regulation of the gene agree with the results obtained with the bivalve mollusk *A. purpuratus* at similar copper concentrations, where an down-regulation of NADH dehydrogenase was observed in the first 4 days of exposure to copper, and then it was up-regulated (Zapata et al., 2009). These results potentially indicate a modification of mitochondrial activity. The disturbance of this cellular organelle can give rise to oxidative stress. In fact, among the genes belonging to this metabolic pathway, NADH dehydrogenase is the first damaged component and it can act as a free radical attractor to maintain cellular homeostasis (Zapata et al., 2009). It has been reported that the inhibition of the structural gene of NADH dehydrogenase subunit 4 alters the properties of the respiratory chain (Dzelzkalns et al., 1994). On the other hand, Rodríguez-Montelongo et al. (2006) indicate that NADH protects the respiratory chain increasing resistance to the damage caused by high concentrations of copper and hydroperoxides.

Copper also participates in cellular respiration by means of the activity of cytochrome c oxidase (Namslawer and Brzezinski, 2004). In our study we have found that the relative expression of the

genes involved in the respiratory chain were expressed differentially. Thus, in the case of cytochrome oxidase subunit 1 and cytochrome oxidase subunit 3 genes, they showed a gene expression peak at 12 h of exposure to 2.5 and 10 µg/L of  $\text{Cu}^{2+}$ , respectively, while the cytochrome c oxidase two genes showed a significant inhibition of the expression levels only at 12 h of exposure to 2.5 and 10 µg/L of  $\text{Cu}^{2+}$ . The activities of the subunits of cytochrome c oxidase can be significant for the cellular metabolism of copper and for protection against oxidative stress. This agrees with the results obtained by Gatlin and Wilson (1986) in a study on fish, who indicate that a variation in the concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  involves a reduction of the activity of cytochrome c oxidase.

The expression of two genes related to cellular and energy metabolism were inhibited in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  at 168 h of exposure to the two concentrations used in this study. The decrease in the expression of the gene that codes for ATP synthase indicates a reduction in the stored energy required for maintaining the growth of the organisms and that the metabolic energy pathway (energy production and conversion) in the control and in the treatments with  $\text{Cu}^{2+}$  were unequal, suggesting that a large part of the energy is devoted to the response to the metal stress. A similar trend has also been observed in a study made with the abalone *H. diversicolor supertexta* exposed to environmental pollutants (endocrine disrupting compounds, EDCs) (Zhou et al., 2010). The other gene related to cellular and energy metabolism coding for





**Fig. 3.** Analysis of differential expression of genes in recently weaned *H. rufescens* (initial size  $1.5 \pm 0.2$  mm) exposed to 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{+2}$  for 3, 12, 24, 72 and 168 h. Bars represent the mean of three replicates per sampling point and error bars show SD. (A) Cellular communication; (B) development and differentiation; (C, D, L and M) respiratory chain; (E) cytoskeleton organization; (F and N) general and energetic metabolism; (G, H and I) stress protein; (J and F) protein regulation. White bars: control, gray bars: 2.5  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{+2}$ , black bars: 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{+2}$ ; \*significant at the 5% level compared with the control.

alginase, which is an enzyme found in mollusks, algae and bacteria, which degrade alginate (Shimizu et al., 2003). The low expression of this gene as a consequence of exposure to the different copper concentrations would indicate a drop in the digestive metabolism and therefore a drop in the nutritional status of the abalone, decreasing the precursors of the synthesis of proteins, lipids and sugars (Ten Doeschate and Coyne, 2008).

The relative expression of the gene encoding for senescent protein showed a significant inhibition only at 24 h of exposure at both metal concentrations. So far there are no reports of a true expression kinetics for this gene in mollusks, however this gene has been the subject of much research in the field of botany, which

assigns multiple functions to it such as the regulation of catabolic processes, the decline and progression of apoptosis, and the detoxifying role of ROS, thereby maintaining cellular integrity and protection (Weaver et al., 1998; Sperotto et al., 2008). Therefore, the trend observed in the expression kinetics of this transcript in the abalone suggests an inefficient role in cellular detoxification.

In this study the expression of the transcripts of genes related to stress proteins (ferritin, laminin and senescent protein) was inhibited significantly at  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations of 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$ . Ferritin is considered a key stress protein due to its similarity with proteins involved in detoxification processes triggered by stress (Gueguen et al., 2003), that participates in the metabolism of iron (Recalcati

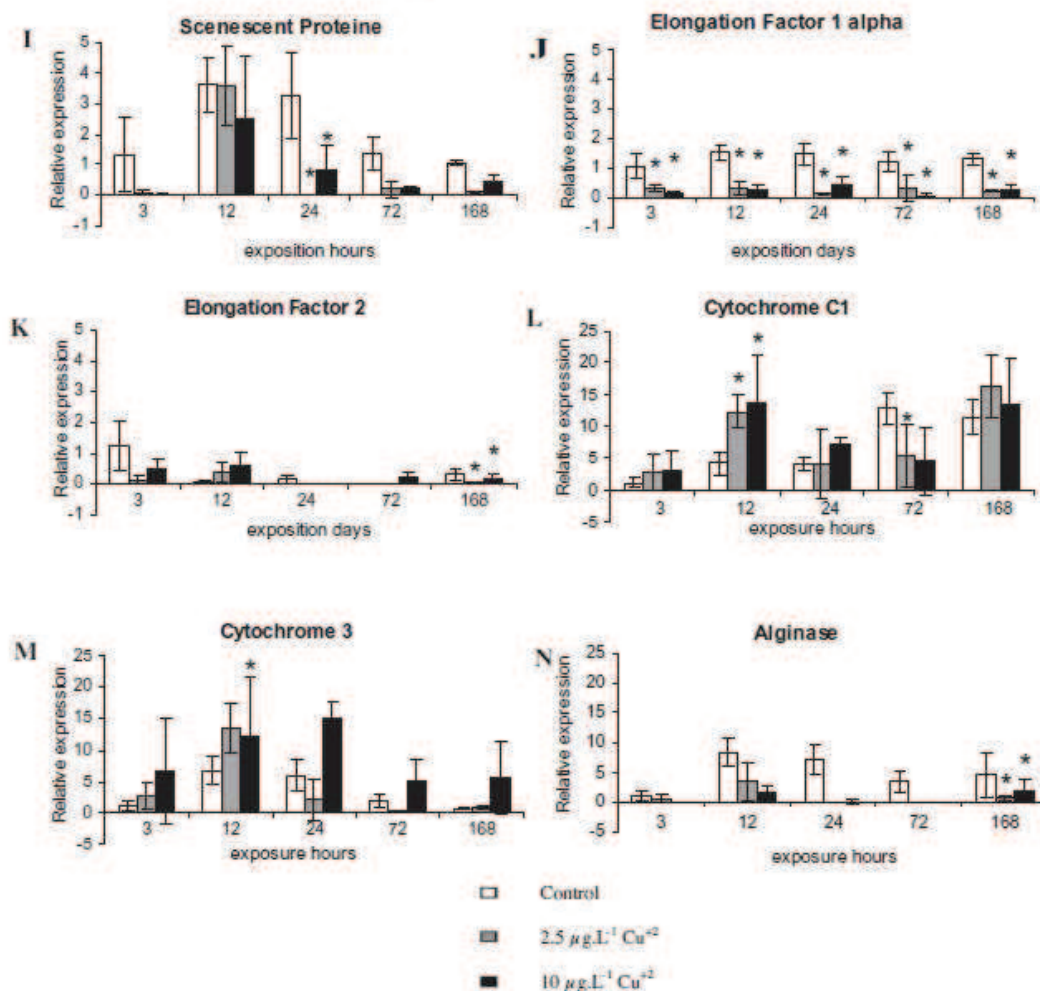


Fig. 3 (continued)

et al., 2008), regulates free cations as a defense mechanism against alterations of plasma proteins and of copper and zinc concentrations in serum during the inflammatory process in the immune response of marine invertebrates (Beck et al., 2002). Collin et al. (2010) found a low regulation of the expression of ferritin coding genes in *Crassostrea gigas* exposed to pesticides. On the other hand, studies made on the abalone *Halotis tuberculata* under bacterial stress showed a decrease of the expression of ferritin in dying organisms, pointing to inefficiency of the heavy metal detoxification process and less control in the production of ROS (Travers et al., 2010). Another gene related to stress proteins is the one that codes for laminin, which is a glycoprotein expressed embryonically that is found largely in all tissues, essential for assembling the basal membrane (Yurchenco and Waddsworth, 2004), that has been found in the foot of abalone (Harris et al., 2006). So far there is no evidence of the involvement of laminin in the response to heavy metals, but the results of our study suggest that the low expression of this transcript would decrease the synthesis of basal membrane as a result of the continuous exposure to the two  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations.

The expression of the genes associated with protein regulation of this study (*EF1 $\alpha$*  and *EF2*) was inhibited significantly at 168 h of exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  at the two concentrations used. The elongation factor (EF) is one of the protein families with GTPase activity with two main elongation factors (*EF1 $\alpha$*  and *EF2*), and there are eukary-

ote cells with multiple and divergent roles in the cellular metabolism affecting mainly the cytoskeleton, peptide synthesis, and protein degradation (Wintermeyer and Rodnina, 2000). In *C. gigas* exposed to extended thermal stress the expression of EF was strongly down-regulated in gills after 24 days (Meistertzheim et al., 2007). The results of the present work suggest that the low expression of these transcripts in the treatments with  $\text{Cu}^{2+}$  involves a slow metabolic rate due to a decrease of the energy consumed in the transcription and translation processes of proteins, indicating that these transcription factors are regulated through feedback mechanisms, inducing their own inactivation (Kohn et al., 2004).

Calponin 2 is a structural protein that is part of the cytoskeleton (Somboonwiwat et al., 2006) and is involved in muscular activity (Funabara, 2004), especially in the conformational change of actin (Noda et al., 1992). In the present study the gene expression of calponin 2 was significantly reduced at 24 h of exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  at the two concentrations used. The alteration of this protein's function as a consequence of stress by  $\text{Cu}^{2+}$  can result in the loss of muscle tone in the organisms and in the gradual decrease of movement, which is a sign of an affected physiology. The low expression of the gene that codes calponin 2 has been reported for *H. tuberculata* in response to a bacterial type stress that affects the mobility of the individuals (Travers et al., 2010).

The *vdg3* gene, associated with development and differentiation, showed significant inhibition in its relative expression from 3 to



24 h of exposure to 2.5 µg/L Cu<sup>2+</sup> and 168 h of exposure to 10 µg/L Cu<sup>2+</sup>. It has been described that the protein products of gene *vdg3* play a crucial role in digestion and in the morphogenesis of the post-metamorphosis intestine of larvae of the abalone *Haliotis asinina* (Jackson et al., 2005) in response to a biofilm of a coralline algae as an initial stimulus for larval fixation and later metamorphosis.

LPr1 is a cellular signaling and multifunctional scavenger molecule which when influenced in its expression can affect the immune response by modifying the regulation of the proteolytic cascade signals (Gubb et al., 2010). In our study the LPr1 gene was inhibited significantly up to 24 h of exposure to 2.5 and 10 µg/L Cu<sup>2+</sup>. These results suggest an alteration at the cellular signaling regulation level under the effect of the Cu<sup>2+</sup> stress. So far there are no studies on the expression of this gene in marine organisms as a consequence of stress by heavy metals, but a study made to determine the immunological response in the snail *Biomphalaria glabrata* to an infection by the parasite *Schistosoma mansoni* showed an over-regulation of the transcripts that code this gene involved in the innate defense signaling system (Ittiprasert et al., 2010).

In conclusion, the present study suggests that low copper concentrations can alter the development and kinetics of eight physiological functions of *H. rufescens* in a critical period of the life cycle that corresponds to the feeding change. Abalones represent an important aquatic resource at the world trade level. We have focused on the identification of genes regulated by metal stress because they are essential for our understanding of pollution in the marine environment. This study can provide information for the characterization of potential genomic markers that may be used in future environmental monitoring and in the investigation of new copper stress mechanisms in this marine species cultivated at present in tanks on land, especially in a critical stage of its development. The results constitute a preliminary functional basis of the resistance and susceptibility of these organisms to the stress caused by copper, mainly in those potential coastal zones for the cultivation of abalone. Further studies of the transcriptomics and proteomics of different development stages of this mollusk are necessary to improve our knowledge of larval, juvenile and adult ontogenesis and to understand the response and adaptation mechanisms of these organisms to multiple environmental stressors, mainly in the coastal zones of the north of Chile, which are highly impacted by heavy metals and are potential marine zones for the cultivation of this species, and which may affect the development of this organisms in future marine concessions.

## Accession numbers

The ESTs generated from this study have been deposited in GenBank and were assigned accession numbers from H0188884 to H0189237.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the aquaculture company Cultivos Marinos San Cristobal S.A., Chile, who allowed the use of their facilities to carry out the experiments. Thanks are also to the Ouest-G n p le sequencing platform in Roscoff, France.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.023.

## References

- Achard-Joris, M., 2005. Etudes biochimiques et g n tiques de la r ponse adaptative de mollusques face aux contaminations m talliques et au stress oxydant. Th se de Doctorant de l'Universit  Bordeaux 1.
- Araya, R., Bahamondes, C., Barahona, K., Silva-Aci res, F., 2010. Application of multi-specific microalgae biofilm for optimization of the larvae settlement and growth of abalone (*Haliotis rufescens*) in a commercial hatchery. *Revista de Biolog a Marina y Oceanograf a* 45 (1), 59–69.
- Beck, G., Ellis, T.W., Habicht, G., Schl ter, S., Marchalonis, J., 2002. Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm molecule. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 11–26.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157.
- Bremner, I., 1998. Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1069–1073.
- Carbajal-Miranda, M., Sanchez-Saavedra, M., Simental, J., 2005. Effect of monospecific, mixed benthic diatom cultures on the growth of red abalone postlarvae *Haliotis rufescens* (Swainson 1822). *J. Shellfish Res.* 24 (2), 401–405.
- Collin, H., Meistertzheim, A.L., David, E., Moraga, D., Boutet, I., 2010. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) to pesticide exposure under experimental conditions. *J. Exp. Biol.* 213, 4010–4017.
- Cu  llar, L., Cu  llar, M., 2000. Contaminaci n, animales acu  ticos y acuicultura. Facultad de Veterinaria U.C.M. <http://www.racve.es/actividades/zootecnia/2000-06-9LeopoldoCuellarCarrasco.htm>.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS* 272, 5635–5652.
- Davis, G., Faulkner, K., Halvorson, W., 1994. Ecological monitoring in Channel Islands National Park, California in The fourth California islands symposium: update on the status of resources, W. L. Halvorson, editor. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara, CA, 465–482 pp. <http://www.nature.nps.gov/im/>.
- De Gregori, I., Pinochet, H., Gras, N., Mu  oz, L., 1996. Variability of cadmium, copper and zinc levels in mollusc and associated sediments from Chile. *Environ. Pollut.* 92, 359–368.
- Department of Fish and Game (DFG), 2003. Abalone Recovery and Management Plan. State of California, Resources Agency. <http://www.dfg.ca.gov/mrd/arm/index.html>, December 7, 2003.
- Dzelzkalns, V., Obinger, C., Regelsberger, C., Niederhauser, H., Kamensek, M., Peschek, C., Bogorad, L., 1994. Deletion of structural gene for the NADH-dehydrogenase subunit 4 of *Synechocystis* 6808 alters respiratory properties. *Plant Physiology* 106, 1435–1442.
- Enriquez, R., Villagr  n, R., 2008. La experiencia del desarrollo del cultivo de abal  n (*Haliotis* spp.) en Chile: oportunidades y desaf  os. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 27, 103–112.
- Flores-Aguilar, R.A., Guti  rrez, A., Ellwanger, A., Searcy-Bernal, R., 2007. Development and current status of abalone aquaculture in Chile. *J. Shellfish Res.* 26 (3), 705–711.
- Funahara, D., 2004. Studies on the regulatory mechanisms involved in catch contraction of molluscan smooth muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi* 70, 508–511.
- Gatlin, D., Wilson, R., 1986. Dietary copper requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 54, 277–285.
- Gubb, D., Sanz-Parra, A., Barcena, L., Tr  xler, L., Fullaondo, A., 2010. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Review. Biochimie* 92, 1749–1759.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumigu  re, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E., Escoubas, J.M., 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303, 139–145.
- Guillard, R., Rhyter, J., 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 2000. Free radicals and antioxidants and the years 2000. *Ann. NY Acad. Sci.* 899, 136–147.
- Harris, L., Lambkin, H., O'Byrne-Ring, N., 2006. Characterisation of cell types in abalone (*Haliotis* spp.) tissues using immunohistochemical techniques. *Aquaculture* 261, 1413–1421.
- Hunter, K., Ho, F., 1991. Phosphorus-cadmium cycling in the northeast Tasman Sea, 35–40  S. *Mar. Chem.* 33, 279–298.
- Ittiprasert, W., Millera, A., Myersa, J., Nenec, V., El-Sayed, N., Knight, M., 2010. Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 169, 27–39.
- Jackson, D., Ellemor, M., Degnam, B., 2005. Correlating gene expression with larval competence, and the effect of age and parentage on metamorphosis in the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Mar. Biol.* 147, 681–697.
- Jia, X., Zhang, Z., Wang, G., Zou, Z., Wang, S., Huang, B., Wang, Y., 2009. Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of genes related to Tributyltin (TBT) exposure in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 4, 255–262.
- Jickells, T., Burton, J., 1988. Cobalt, copper, manganese and nickel in Sargasso Sea. *Mar. Chem.* 23, 131–144.



- Kang, Y.S., Kim, Y.M., Park, K.I., Cho, S.K., Choi, K.S., Cho, M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1119–1131.
- Kim, K.-Y., Lee, S., Cho, Y., Bang, I., Kim, K., Kim, D., Nam, Y., 2007. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1043–1059.
- Kohn, K., Riss, J., Aprelikova, O., Weinstein, J., Pommier, Y., Barrett, J., 2004. Properties of switch-like bioregulatory networks studied by simulation of the hypoxia response control system. *Mol. Biol. Cell* 15, 3042–3052.
- Kudo, I., Kokubun, H., Matsunaga, K., 1996. Cadmium in the southwest Pacific Ocean. Two factors significantly affecting the Cd-PO4 relationship in the ocean. *Mar. Chem.* 54, 55–67.
- Leighton, D., 2000. The influence of temperature on larval and juvenile growth in three species of southern California abalones. *Fish. Bull.* 72, 1137–1145.
- Linder, M.C., 1991. The Biochemistry of Copper. In: Frieden, E. (Ed.), Plenum Press, New York, NY.
- Livak, K., Schmittgen, T., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods* 25, 402–408.
- Lotze, H., Lenihan, H., Bourque, B., Bradbury, R., Cooke, M., Kay, M., Kidwell, S., Kirby, M., Peterson, C., Jackson, J., 2006. Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science* 312, 1806–1809.
- Meistertzheim, A., Tanguy, A., Moraga, D., Thébault, M.T., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS J.* 274, 1–11.
- Muir, D., Shearer, R., Van Oostdman, J., Donaldson, S., Furgal, C., 2005. Contaminants and Canadian arctic biota and implications for human health: conclusion and knowledge gaps. *The science of total. Environment* 351–352, 539–546.
- Namslauer, A., Brzezinski, P., 2004. Structural elements involved in electron-coupled proton transfer in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* 567, 103–110.
- Noda, S., Ito, M., Watanabe, S., Takahashi, K., Maruyama, K., 1992. Conformational changes of actin induced by calponin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 481–487.
- Ravera, O., Riccardi, N., 1997. Biological monitoring with organism accumulator of pollutants. *Mar. Chem.* 58, 313–318.
- Recalcati, S., Invernizzi, P., Arosio, P., Cairo, G., 2008. New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity. *J. Autoimmun.* 30, 84–89.
- Rodríguez-Montelongo, L., Volentini, S., Fariás, R., Massa, E., Rapisarda, V., 2006. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 451, 1–7.
- Salamanca, M., Camano, A., Jara, B., 2000. Distribución de Cu, Pb y Zn en aguas costeras de bahía San Jorge en el Norte de Chile. *Gayana* 64 (2), 195–204.
- Salamanca, M., Jara, B., Rodríguez, T., 2004. Niveles de Cu, Pb y Zn en agua y *Perumytilus purpuratus* en Bahía San Jorge, Norte de Chile. *Gayana* 68 (1), 53–62.
- Shimizu, E., Ojima, T., Nishita, K., 2003. CDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*. *Carbohydr. Res.* 338, 2841–2852.
- Somboonwiwat, K., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A., 2006. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 26–36.
- Sperotto, R.A., Boff, T., Duarte, G.L., Fett, J.P., 2008. Increased senescence-associated gene expression and lipid peroxidation induced by iron deficiency in rice roots. *Plant Cell Rep.* 27, 183–195.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., Moraga, D., 2010. Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Mar. Genomics* 3, 133–143.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticides exposure. *FEBS* 272 (2), 390–403.
- Tanguy, A., Bierre, N., Saavedra, C., Pina, B., Bach, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., Boutet, I., Cancela, L., Dossat, C., Favrel, P., Huvel, A., Jarque, S., Jollivet, D., Klages, S., Lap, S., Leite, R., Moal, J., Moraga, D., Reinhardt, R., Samain, J.F., Zouros, E., Canario, A., 2008. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* 408, 27–36.
- Ten Doeschate, K., Coyne, V., 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284, 174–179.
- Travers, M., Meistertzheim, A., Cardinaud, M., Friedman, C., Huchette, S., Moraga, D., Paillard, C., 2010. Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 289–297.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2006. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere* 62, 1033–1042.
- Viana, A., 2002. Avances en la nutrición, fisiología digestiva y metabolismo del abulón. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortes, M.G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuicola*, 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México, pp. 1–16.
- Viana, A., 2005. Radiografía del cultivo del abulón en Chile. Boletín informativo trimestral de la 761 Sociedad Mexicana de Abulón. Boletín I año 6 Enero-Marzo, 6 pp.
- Wang, K., Ren, H., Xu, D., Cai, L., Ming, Y., 2008. Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1326–1347.
- Weaver, L., Gan, S., Quirino, B., Amasino, R., 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37, 455–469.
- Wintermeyer, W., Rodina, M., 2000. Translational elongation factor G: a GTP-driven motor of the ribosome. *Essays Biochem.* 35, 117–129.
- Yeh, S.T., Liu, C.H., Chen, J.C., 2004. Effect of copper sulfate on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 437–446.
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F., Stewart, C., 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinf.* 7, 85–97.
- Yurchenko, P., Waddsworth, W., 2004. Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 572–579.
- Zapata, M., Tanguy, A., David, E., Moraga, D., Riquelme, C., 2009. Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. *Gene* 442, 37–46.
- Zhou, J., Cai, Z., Li, L., Gao, Y., Hutchinson, T., 2010. A proteomics based approach to assessing the toxicity of bisphenol A and diallyl phthalate to the abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Chemosphere* 79, 595.

**Conclusion sur le chapitre II-A.**

Les concentrations en cuivre utilisées dans cette étude sont communément trouvées dans le littoral du Nord du Chili et les résultats obtenus sur *Haliotis rufescens* issus d'écloseries industrielles nous renseignent que la survie des juvéniles n'est pas affectée par ce métal. La technique des banques soustractives nous a permis de réaliser une première exploration sur les transcrits associés aux réponses moléculaires de l'animal face au cuivre, surtout dans la phase critique du cycle de vie des ormeaux lorsqu'ils changent d'alimentation (Sevrage). Nous avons ainsi mis en évidence un nombre de gènes (108) potentiellement impliqués dans la réponse à ce stress en condition expérimentale. Les résultats mettent en relief la diversité des fonctions physiologiques mises en jeu par les organismes dans la réponse au stress métallique. L'expression de gènes par qPCR en temps réel a ensuite permis de confirmer et de préciser les variations temporelles d'expression induites par l'exposition à ce stress. Cette étude montre donc que le cuivre même à concentrations modérées peut modifier de façon significative l'expression de certains gènes impliqués dans des voies métaboliques clefs des organismes. Parmi ces séquences, des gènes codant pour des protéines liés aux voies métaboliques impliquées dans la communication cellulaire (Lpr1), le développement (vdg3), le métabolisme de l'énergie (ATP synthase), la respiration cellulaire (cytochrome oxydase 2), protéine de stress (laminine), la régulation des protéines (facteur d'élongation 1-alpha et facteur d'élongation 2) et de protéine classiquement connue pour être régulée par des stress métalliques telle que la Ferritine, ont été mises en évidence dans cette première partie de l'étude. Enfin, cette étude a permis d'obtenir des séquences partielles d'ADNc qui permettra la caractérisation des gènes correspondants.

Cette première étude sur la régulation génique par ce métal sera approfondie par une étude immunologique des paramètres hématologiques et développée dans le chapitre II B.

**B. Effets du cuivre sur les activités  
d'immunomodulation hémodocytaire d'*Haliotis*  
*rufescens*.**

## Généralités

Les paramètres hématocytaires ont été reconnus comme des outils importants dans l'évaluation des conditions cellulaires et physiologiques des organismes en réponse à un stress environnemental (Jyothirmayi & Rao, 1987). Il existe une carence d'informations concernant les ormeaux et les gastéropodes en général en ce qui concerne l'effet du cuivre sur les paramètres hématocytaires. Les informations sont limitées et parcellaires et concernent principalement la réponse immunitaire d'*H. diversicolor supertexta* à des facteurs tels que l'agitation mécanique (Malham et al., 2003), la température, la salinité, l'oxygène dissous (Cheng et al., 2004a-c), les composés azotés (Cheng et al., 2004d-e) et les xénobiotiques comme le tributyl-étain (TBT) et le benzo [a] pyrène (Gopalakrishnan et al., 2009, 2011). Concernant, l'effet du cuivre chez *H. rufescens*, les études ont ciblé certains paramètres physiologiques comme la concentration de métabolites liés à la respiration cellulaire (Viant et al., 2002) et la survie des larves et des juvéniles (Gorski & Nugegoda, 2006). Cependant à notre connaissance, aucune étude concernant la fonctionnalité du comportement hémolymphatique a été réalisée chez l'ormeau rouge en condition de stress métallique.

Dans ce contexte, l'effet du cuivre sur les capacités des réponses cellulaires et humorales des cellules hématocytaires de cette espèce a été évalué à l'aide de techniques immunologiques pour évaluer certains paramètres physiologiques comme :

- La numération d'hématocytes circulants totaux
- La phagocytose
- L'activité de l'enzyme phénoloxydase
- La production d'anions superoxydes



Ces travaux et les résultats obtenus sont présentés dans l'article intitulé :

*Effect of copper on the immunomodulatory activities of hemocytes in juveniles abalone, Haliotis rufescens cultivate in hatchery conditions. Soumis dans Aquaculture (2013).*

**Effect of copper on the immunomodulatory activities of haemocytes in juveniles of the abalone *Haliotis rufescens* cultivated under hatchery conditions**

**Fernando Silva-Aciares<sup>1,2\*</sup>, Dario Moraga<sup>2</sup> & Carlos Riquelme<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad de Antofagasta 170 Antofagasta. Chile.

<sup>2</sup> UMR CNRS 6539-LEMAR (Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin), IUEM (Institut Universitaire Européen de la Mer), Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

**Abstract**

The effect of short-term exposure to copper on the cellular and physiological response in hemocytes of juvenile abalone *Haliotis rufescens* cultivated in hatcheries in the north of Chile is evaluated. The animals were exposed for 168 hours to concentrations of 2.5 µg/L and 10 µg/L of  $\text{Cu}^{+2}$ , which have been reported as representative of coastal zones close to mining activity, particularly copper mining. The hemocytes were collected from the animals and the effect of the metal was quantified through the total hemocyte count (THC), phagocytosis, phenoloxidase activity, and generation of superoxide anions. The results showed that copper exposure decreased THC and phagocytosis significantly, while phenoloxidase activity and superoxide anions production increased significantly with respect to untreated controls. This study suggests a relation between exposure to the trace copper concentrations and the alterations of in vitro cellular and physiological parameters of the abalone's immune system in a dose- and time-dependent manner. This study emphasize the importance of heavy metal contamination on abalone cultures considering that the hemocytes are crucial for the proper function of the immune system and important health indicators to evaluate the effect of ambient stress factors on these organisms.

**Keywords:**

*Haliotis rufescens*, copper, haemocytes, immunomodulatory activities.

## 1. Introduction

The great development of industrialization processes in the world has brought about as a consequence the release of toxic wastes that are leaked into the marine ecosystem, many of them, like trace metal ions, highly toxic to aquatic organisms (Scelzo, 1997). The fast industrial mining development has caused great degradation of marine ecosystems, including the coastal fish resources from which the human communities located in these areas depend. Contamination with copper ions occurs mostly in the neighborhood of the mining centers where the metal is processed, or during refinery to obtain metallic copper (Riedel, 2008; Valdés et al., 2011). The north of Chile is the main copper production zone in the world, and the presence of high concentrations of this metal is a source of contamination in the coastal zone of the north of Chile (Salamanca et al., 2000).

The introduction of the abalone along the South Pacific coast can be subject to strong anthropogenic environmental pressure having an impact on the survival and maintenance of this mollusk. This massive development of human activities (mainly mining activities) on the coast, together with a demographic increase in the coastal zones, has intensified considerably the stress factors in those areas (David et al., 2005, Lotze et al., 2006).

Copper is an essential micronutrient that is a part of vital structural and functional components of marine organisms (White and Rainbow, 1985) and it is involved in many key metabolic processes such as electron transport in photosynthesis (Raven et al., 1999), mitochondrial respiration (Salviati et al., 2002), response to oxidative stress (Won et al., 2012), transcriptional signaling (Mori and Schroeder, 2004), DNA integrity (Vosloo et al., 2012), oxidative phosphorylation, iron mobilization (Lall, 2002), and an allosteric factor for various enzymatic systems (Salviati et al., 2002; Muñoz et al., 2006; Zhang et al., 2011; Rubino and Franz, 2012). However, high copper concentrations are considered toxic in the marine environment (Piola and Johnston, 2006) because it affects the physiological and biochemical functions of organisms such as, glycolysis (Carvalho and Fernández, 2008), the Krebs cycle (Couture and Kumar, 2003), osmotic and ionic regulation (Pinho et al., 2007),

acid-base balance and ammonia excretion (Blanchard and Grosell, 2006), oxygen consumption, growth and development (Manyin and Rowe, 2009), and carbohydrate metabolism (Lauer et al., 2012). Most of these effects can be associated directly or indirectly with insufficient production of energy to maintain metabolism and homeostasis. Under extreme conditions these physiological changes induced by copper can even cause the death of the organism (Lauer et al., 2012).

Beside the parameters described above, the hemocytic parameters have been recognized also as important tools in the evaluation of the cellular and physiological conditions of the organisms and their physicochemical changes in response to environmental stress (Jyothirmayi and Rao, 1987). The immune system of the mollusks depends mainly on innate immunity and more specifically on circulating haemocytes (Gopalakrishnan et al., 2011), which are involved in phagocytosis, an important process for the elimination of microorganisms or foreign particles (Bayne, 1990). On the other hand, haemocytes are associated with the prophenoloxidase cascade that through phenoloxidase, a copper-dependent enzyme, catalyzes the conversion of phenols into cytotoxic quinones, capable of eliminating infectious agents (Muñoz et al., 2006; Bryan-Walker et al., 2007). These molecules in turn can be polymerized into melanin, which is involved in the process of immobilization and encapsulation of numerous invading microorganisms (Söderhäll et al., 1996). During the process of phagocytosis various reactive oxygen species (ROS) are also produced which are compounds with high microbicidal activity that can also be harmful to the host organism (Klebanoff, 1982).

*H. rufescens* is a herbivorous marine species and one of the most important commercial gastropods cultivated in Chile and in the world (Enríquez and Villagrán, 2008). There are very few studies related to the immune parameters of abalone, and they are mainly limited to the immune response of *H. diversicolor supertexta* to factors such as mechanical agitation (Malham et al., 2003), temperature, salinity, dissolved oxygen (Cheng et al., 2004<sub>a-c</sub>), nitrogenated compounds (Cheng et al., 2004<sub>d-e</sub>) and xenobiotic pollutants such as tributyltin and benzo[a]pyrene (Gopalakrishnan et al., 2009; 2011). On the other hand, with *H. rufescens* there are only reports on the effect of copper on the



concentration of metabolites related to cellular respiration (Viant et al., 2002) and the survival of larvae and juveniles of these animals (Gorski and Nuggeoda, 2006). However, none of these studies on *H. rufescens* have measured immunological parameters.

The present paper aims to evaluate the immunologic response of juvenile post-weaning *H. rufescens* abalone cultivated in hatcheries under conditions of metal ions stress due to copper in the northern zone of Chile. “Weaning” is a critical stage in the biological cycle of abalone that consists in the transition from an exclusively microalgal feeding regime to a macroalgae diet, in which high mortality occurs among post-weaned juveniles (Flores-Aguilar et al., 2007), probably as a consequence of the metabolic digestive change (Viana 2002) and the presence of opportunist pathogens (Handlinger et al., 2005; Sawabe et al., 2007). This immunologic study is indispensable because the potential marine cultivation zones of this species are contaminated with copper mainly from mining activities, and it is necessary to have the background information of the real impact of the trace metal on the immunomodulation mechanisms that can provide information on the physiological condition of the abalone and be able to anticipate possible mortality in a medium impacted by copper.

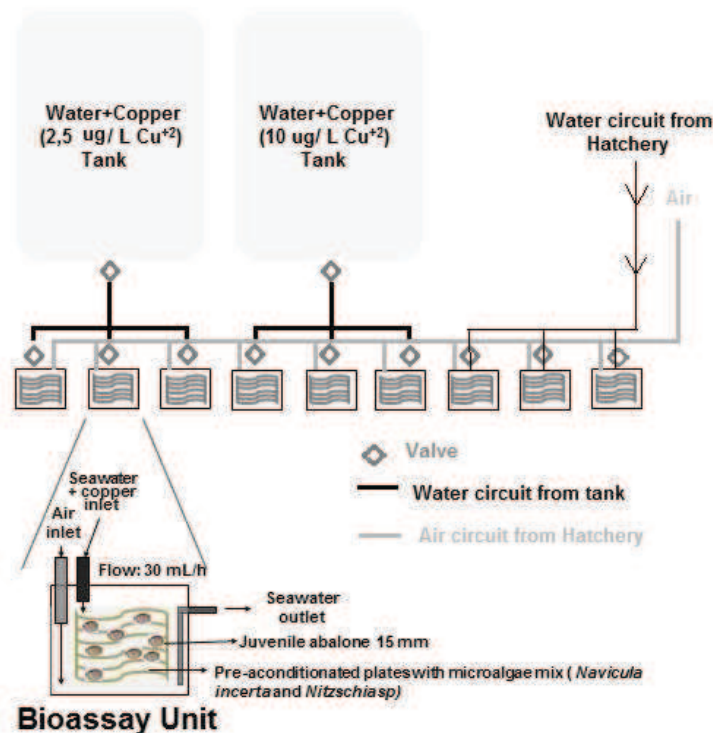
## 2. Materials and methods

### 2.1 Animals

Juvenile 8-month old (post-fertilization) weaned individuals of *H. rufescens* of 15 mm initial size ( $0.75 \pm 0.10$  g) were donated by the commercial hatchery Liveseafood S.A. (29° 56' S, 71° 20' W) located in the northern zone of Chile. Prior to the experimental procedure the animals were preconditioned during one week in 1000-liter tanks with a supply of seawater filtered through 10  $\mu$ m, with constant circulation, at a mean temperature of 18 °C and an average salinity of 35‰, feeding them with microalgae (*Nitzschia* sp. and *Navicula incerta*) and macroalgae (*Macrocystis pyrifera* and *Lessonia nigrescens*). Before the experimental procedure the animals fasted for 48 hours.

## 2.2 Conditions of copper exposure

The animals from the preconditioning stage were placed in plastic bioassay units (10 x 11 x 12 cm) with a volume of 1 L each, in which there is a rack with 4 polycarbonate plates 10 x 10 cm each, with continuous aeration and an average salinity of 35‰, which were preconditioned with the benthic diatoms *Nitzschia sp.* and *Navicula incerta* (Figure 1) according to the methodology described by Silva-Aciaries et al. (2011). The animals were also fed a supplement of the macroalgae *Macrocystis pyrifera* and *Lessonia nigrescens* at a rate of 25% of the abalone's body weight.



**Fig. 1.** Diagram of the exposure bioassay system used to exposed juveniles *H. rufescens* to copper.

Each copper concentration and the control (without copper) were tested in triplicate in the bioassay units containing 10 abalones each. The copper concentrations tested (copper (II) chloride,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) were  $2.5 \mu\text{g/L}$  and  $10 \mu\text{g/L}$  of  $\text{Cu}^{+2}$ . The low and high copper concentrations were chosen based on the values reported in water in the north of Chile close to mining zones (Salamanca et al., 2004 Valdez et al., 2011). These two copper concentrations have been used previously in

bioassays and did not cause mortality of juvenile abalone as had been reported by Silva-Aciares et al., (2011). In each bioassay unit there was a flow of 30 mL/h of seawater filtered through 1  $\mu$ m, with constant aeration at a mean temperature of 18 °C, coming from two 100-L reservoir tanks, each with a different copper concentration. The copper solutions in the reservoir tanks were renewed every two days. The control treatment was supplemented with water directly from the hatchery's water circulation system. Samples were taken at 0, 3, 12, 24, 72 and 168 h of exposure to the different copper concentrations, removing three abalones at each exposure time, from which the hemolymph was then, extracted using a sterile technique for their corresponding analysis of the hemocytic parameters. All these experiments were carried out at the facilities of the Abalone Liveseafood S.A. hatchery.

### *2.3. Measurement of hemocytic parameters*

#### *2.3.1 Collection de hemolymph*

The hemolymph was collected from the pedal sinus of the muscular foot of each abalone by means of 1-mL sterile syringes and 26G x 1/2 in needles that contained 250  $\mu$ L of PBS (phosphate buffer saline 0.01 M, pH 7.4) and immediately placed in ice to prevent coagulation. At each sampling 250  $\mu$ L of hemolymph were collected from each abalone.

#### *2.3.2. Total hemocyte count (THC)*

THCs (cells/mL) were made with a Neubauer hemocytometer with the samples diluted in PBS. A 25  $\mu$ L sample of hemolymph was placed in the hemocytometer and counted on an inverted phase contrast microscope (Olympus model IX50) under 40x magnification. The counts were made in triplicate for each treatment.

### 2.3.3. *In vitro* phagocytic activity

The phagocytosis tests of the abalone haemocytes exposed to copper were made in monolayers using dead bacteria of *Vibrio parahaemolyticus* as substrate. *V. parahaemolyticus* were grown at 25 °C for 24 h in Tryptone soy Broth (TSB, Oxoid) supplemented with 2.0% (w/v) NaCl. The bacteria were eliminated by addition of 10% formalin and centrifuged at 12000 x g for 10 min to get the pellet. Subsequently, bacteria were labeled with FICT by washing twice in PBS, resuspended in NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.0 containing 0.1 mg/mL of fluorescein 5-isothiocyanate, isomer 1 (FICT, Sigma), as described by Malham et al., (2003), and then incubated at 25 °C for 1 h in the dark. The bacteria were centrifuged, resuspended in PBS, counted, and diluted to a concentration of  $1 \times 10^8$  cells/mL. Aliquots of the bacteria were then stored at -20 °C until their use.

50 µL of the hemolymph suspension were placed inside a silicone ring (1.5 cm<sup>2</sup>) on a glass slide according to a method described by Macey and Coyne (2005). They were prepared in a dark and humid chamber during 20 min to allow adhesion of the haemocytes to the glass. 50 µL of *V. parahaemolyticus* labeled with FICT were added to the hemocytes and were then returned to the incubation chamber for 30 min. The samples were washed three times with PBS before adding 50 µL of a solution of ethidium bromide (Sigma) (50 µg/mL in PBS). The ethidium bromide solution was removed after 1 min by washing successively with PBS. A coverglass was placed on top of the silicone ring. The phagocytic activity was expressed as the percentage of phagocytic hemocytes quantified from 200 adhered hemocytes observed under a fluorescence microscope (Olympus model BH2) with a 488 nm filter, in triplicate for each treatment and sampling time.

### 2.3.4. Phenoloxidase activity

The activity of phenoloxidase was measured spectrophotometrically by recording the formation of dopachrome produced by L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (Coles and Pipe, 1994).

50  $\mu\text{L}$  of hemolymph diluted in PBS were deposited in triplicate on microplates (96-well) and then centrifuged at 300 x g for 15 min. The supernatant was discarded and 50  $\mu\text{L}$  of sodium alginate (0.5 mg/mL in PBS) (used as activator) were added, incubating for 30 min at 26 °C. Then 25  $\mu\text{L}$  of L-DOPA (3 mg/mL in PBS) were added and the optical density was measured at 490 nm for 10 min in a microplate reader (Promega Glomax® model E7031). The control solution (50  $\mu\text{L}$  of hemolymph, 50  $\mu\text{L}$  of PBS and 50  $\mu\text{L}$  of L-DOPA) was used to measure the phenoloxidase base activity in all the treatments. The optical density corresponding to the phenoloxidase base activity was within a range of 0.04 to 0.05. The phenoloxidase activity of all the treatments and the control was expressed on the formation of dopachrome in 50  $\mu\text{L}$  of hemolymph.

#### *2.3.5. Generation of superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) (respiratory burst)*

The in vitro generation of the superoxide anion in the abalone hémocytes was quantified using the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT), a formazan, as a measure of superoxide anions, as described by Cheng et al., (2004<sub>b</sub>). For this, 50  $\mu\text{L}$  of hemolymph diluted in PBS were placed in triplicate on microplates previously covered with 50  $\mu\text{L}$  of a solution of poly-L-lysine (0.2%). The microplates were centrifuged at 300 x g for 15 min. The supernatant was extracted and 100  $\mu\text{L}$  of sodium alginate (0.2 mg/mL in PBS) were added, incubating for 30 min at 26 °C. The sodium alginate was discarded and the hémocytes were stained with 50  $\mu\text{L}$  of an NBT solution (0.3%) for 30 min at ambient temperature. The NBT solution was discarded and the hemocytes were then fixed with 100% methanol, washed three times with 50  $\mu\text{L}$  of 70% methanol, and dried in air. Formazan was dissolved by adding 60  $\mu\text{L}$  of KOH (2 M) and 70  $\mu\text{L}$  of dimethyl sulfoxide (DMSO). The optical density was measured in a microplate reader at 625 nm. The generation of superoxide anion was expressed as the reduction of NBT in 50  $\mu\text{L}$  of hemolymph.



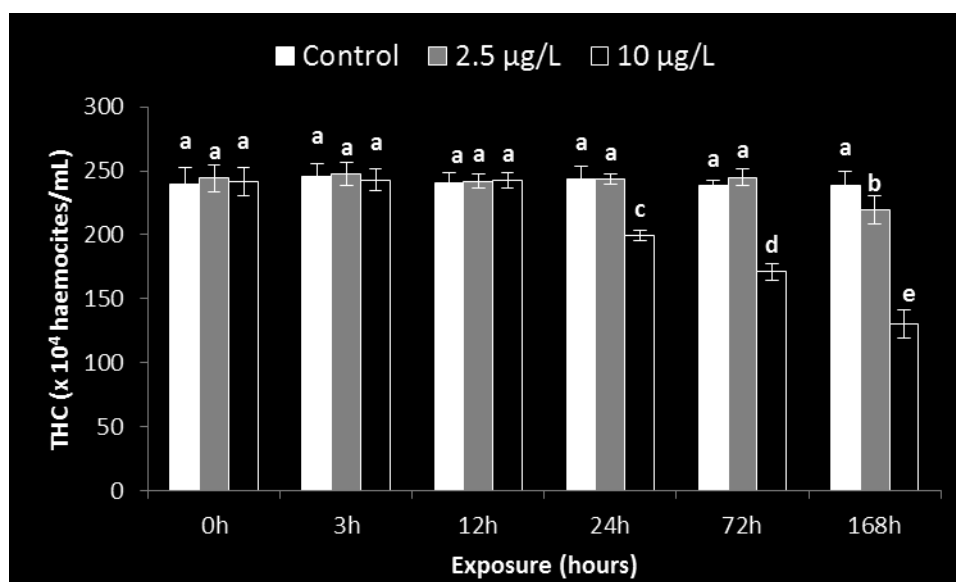
## 2.4. Statistical analyses

All the results expressed as mean and standard deviation were subjected to analysis of variance (ANOVA). When the effects of ANOVA were significant, the determination of the factors that can contribute significant differences was made by means of the Tukey's multiple comparison tests using the MINITAB 15 statistical software. The percentage data (phagocytic activity) were normalized using the arcsine transformation before the ANOVA analysis. Significant differences were set at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Total hemocyte count (THC)

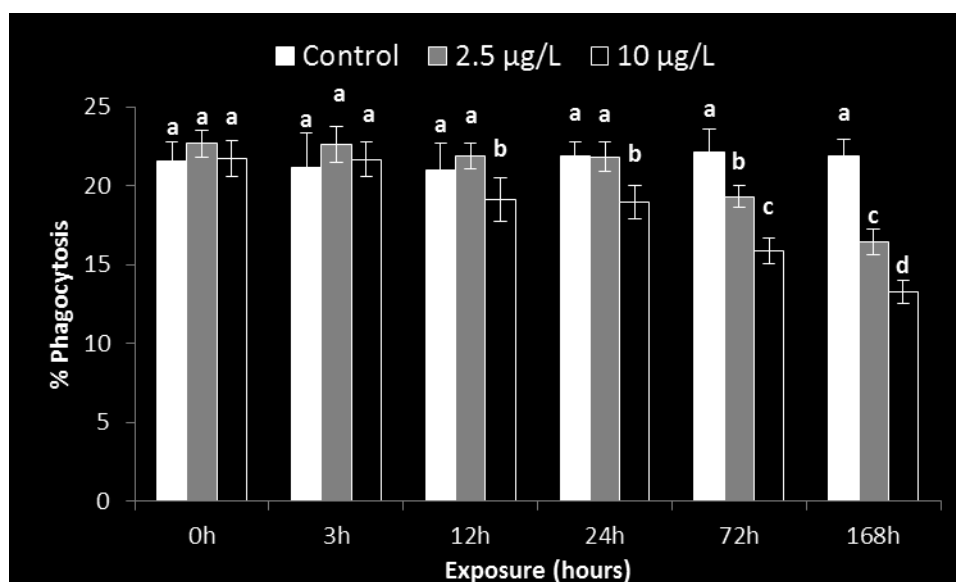
As shown in Figure 2, the mean ( $\pm$  SD) THC values varied from  $247.66 (\pm 8.88) \times 10^4$  cells/mL to  $130.66 (\pm 10.97) \times 10^4$  cells/mL among all the experimental groups with different copper treatments. Without copper exposure, no significant differences in the THCs were observed at different sampling times. In contrast, the THCs in abalones treated with 2.5 and 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  were significantly decreased at 168 and 24 h, respectively, after exposure, compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Comparing each treatment group with the control, the THCs were significantly lower ( $P < 0.05$ ) with the 10  $\mu\text{g/L}$   $\text{Cu}^{2+}$



**Fig. 2.** Effects of different concentrations of copper on Total Hemocytes Circulating (THC) of juvenile *H. rufescens* at the beginning and after 3, 12, 24, 72, 168 h of exposition. Each bar represents the mean of three replicate. Vertical lines represent Standard Deviation. Different letters indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ) between values.

### 3.2. *In vitro* phagocytic activity

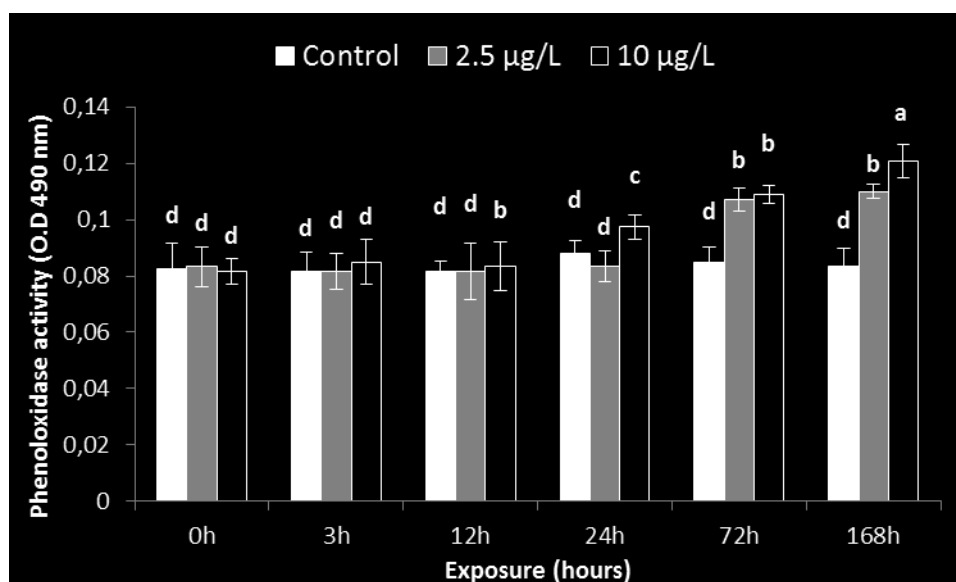
While phagocytic capacity of the haemocytes from the untreated control was not changed at any sampling periods, copper exposure caused a significant decrease beginning at 12 and 72 h after the treatment with 2.5 and 10 µg/L  $\text{Cu}^{2+}$ , respectively, compared to the control ( $P < 0.05$ ). Our results also show that the percentage of haemocytes with phagocytic activity was decreased by copper treatment in a dose-dependent manner (Figure 3).



**Fig.3.** Effects of different concentrations of copper on the Phagocytic activity of hemocytes of juvenile *H. rufescens* at the beginning and after 3, 12, 24, 72, 168 h of exposition. Each bar represents the mean of three replicate. Vertical lines represent Standard Deviation. Different letters indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ) between values.

### 3.3. Phenoloxidase activity

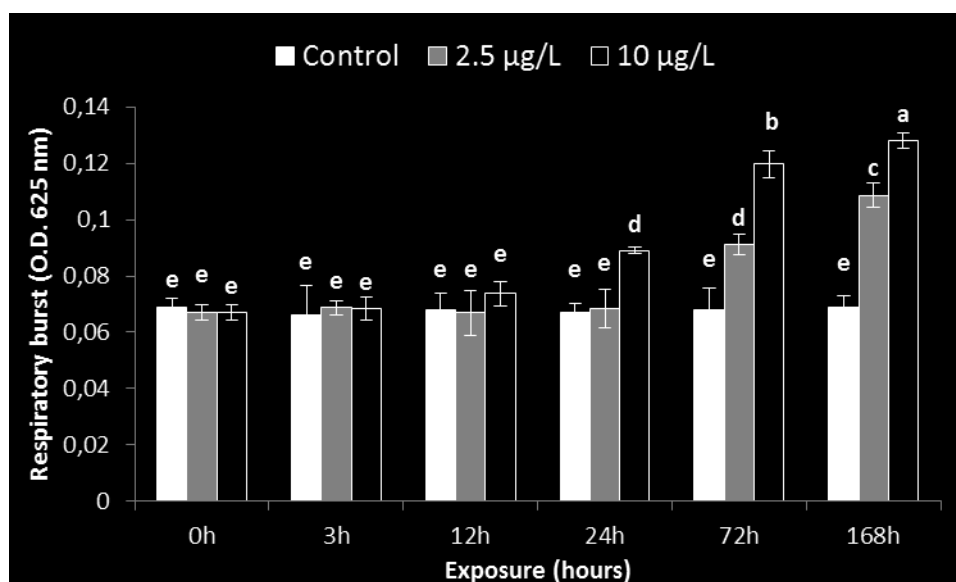
The effect of copper exposure on the activity of haemocyte phenoloxidase is shown in Figure 4. No significant differences were observed among the untreated control groups at any sampling times, whereas the phenoloxidase activity was significantly increased at 24 and 72 h after exposure to 10 and 2.5 µg/L  $\text{Cu}^{2+}$ , respectively, compared to the untreated control ( $P < 0.05$ ). In particular, from 24 to 168 h after exposure, the phenoloxidase activity in the 10 µg/L  $\text{Cu}^{2+}$ -treated groups was higher than that in either the control or 2.5 µg/L  $\text{Cu}^{2+}$ -treated abalones.



**Fig. 4.** Effects of different concentrations of copper on the Phenoloxidase (PO) activity of hemocytes of juvenile *H. rufescens* at the beginning and after 3, 12, 24, 72, 168 h of exposition. Each bar represents the mean of three replicates. Vertical lines represent Standard Deviation. Different letters indicate a significant difference ( $P < 0.05$ ) between values.

### 3.4. Generation of superoxide anion ( $O_2^-$ ) (respiratory burst)

Figure 5 shows the effect of copper exposure on the generation of superoxide anions by haemocytes. While no significant differences were found among the control groups at any sampling times, superoxide anion generation was significantly increased at 24 and 72 h after exposure to 10 and 2.5 µg/L  $Cu^{2+}$ , respectively, compared to the untreated control ( $P < 0.05$ ). Our results indicate that the respiratory burst was increased by copper in a dose-dependent manner from 24 to 168 h after exposure.



**Fig. 5.** Effects of different concentrations of copper on the generation of superoxide anion (Respiratory burst) by haemocytes of juvenile *H. rufescens* at the beginning and after 3, 12, 24, 72, 168 h of exposition. Each bar represents the mean of three replicate. Vertical lines represent Standard Deviation. Different letters indicate a significant difference ( $P<0.05$ ) between values.

#### 4. Discussion

Our results show that exposure of the abalone *H. rufescens* to different copper concentrations caused various effects on its haemocytes. The range of metal concentrations used in this study is normally found in the coastal zones off northern Chile and has been shown to be directly related to mining activity (mainly copper) (Salamanca et al., 2004; Valdés et al., 2011). While these copper concentrations were reported to drastically affect the larval settlement of the bivalve mollusc *Argopecten purpuratus* (Zapata et al., 2009), the same concentrations did not result in mortality in juvenile *H. rufescens* for the same period of times tested in this study (Silva-Aciares et al., 2011). Here, we show that exposure of abalones to 2.5 and 10 µg/L  $\text{Cu}^{2+}$  for 168 h caused a significant dose-dependent decrease in the THC values. To the best of our knowledge, there have been no THC studies on copper-exposed abalones, and only limited studies have been performed on bivalve molluscs. In agreement with previous reports on *Crassostrea virginica* (Cheng, 1988a) and *Crassostrea*

*madrasensis* (Ittoop et al., 2009), our results demonstrate that the THCs were decreased upon copper exposure. Interestingly, similar to our findings, THC alterations described previously in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta* that was exposed to different xenobiotic compounds also caused a decrease in the number of circulating haemocytes in animals (Gopalakrishnan et al., 2009; 2011). We speculate that the dose-dependent THC decrease by copper may be accounted for by either the death of haemocytes or the migration of these cells from the hemolymph to areas of tissues that are prone to damages induced by copper and other stressing agents (Cheng, 1988<sub>a</sub>; Hannan et al., 2009; Gopalakrishnan et al., 2009; 2011). It is known that the invertebrate defence system depends only on an innate immunity system, in which the circulating haemocytes play an important role in the immunomodulation processes of the organisms and can therefore reflect their health conditions (Gopalakrishnan et al., 2011).

Phagocytosis is one of the most important and extensive immune reactions in both vertebrates and invertebrates and is the greatest cellular effector mechanism in the mollusc immune system (Bayne, 1990). As one of the most important parameters in cellular immunity, phagocytosis is considered as a biological indicator for immunotoxicity studies of contaminant-exposed molluscs (Thiagarajan et al., 2006). The effect of trace metals on the phagocytosis of molluscs is dependent on the species studied (Sauvé et al., 2002), as well as on the metal types and concentrations, and exposure time (Cheng and Sullivan, 1984; Cheng, 1988<sub>b</sub>; Brousseau et al., 2000; Matozzo et al., 2001; Thiagarajan et al., 2006; Ittoop et al., 2009). Our results shown in the present study agree with those reported on abalones exposed to organic xenobiotic compounds (Gopalakrishnan et al., 2009; 2011; Zhou et al., 2010) and other bivalve molluscs exposed to copper (Cheng 1988<sub>b</sub>, Matozzo et al., 2001; Thiagarajan et al., 2006; Ittoop et al., 2009). Previously, several studies have suggested the causes of the alterations in phagocytic activity induced by contaminants in molluscs. For instance, Gomez-Mendikute et al. (2002) reported that the alterations of the cytoskeletal components and the production of oxygen radicals resulted in decreased phagocytic activity, when the haemocytes of bivalve molluscs were treated with organic xenobiotic. It has also been shown that the effect of environmental factors



on the phagocytosis of haemocytes in the oyster *Saccostrea glomerata* was regulated by  $\beta$ -adrenergic receptors present on the haemocyte surface (Aladaileh et al., 2008). Specifically, the alterations of the cytoskeleton and the shape of haemocyte pseudopods, as a consequence of the activation of these  $\beta$ -adrenergic receptors, leads to decreased phagocytic activity, due to a reduction in the cell's ability to adhere and interact with foreign particles (Matozzo et al., 2001; Zhou et al., 2010). These alterations can be mediated either directly by metal chelation of cytoskeletal structural proteins and then protein denaturation or indirectly by the alterations of the calcium homeostasis mechanisms and the oxidation of protein SH groups by ROS (Matozzo et al., 2001). It is known that copper has a high affinity for the SH groups of proteins, such as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Viarengo and Nicotera, 1991). Upon the interaction between trace metals and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SH groups, inactivation of the hormone may cause an increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations (Viarengo et al., 1996), which in turn leads to alterations of the cytoskeleton organization, as seen in the phagocytes of tunicates exposed to organic contaminants (Cima et al., 1998). In addition, trace metals can also perturb  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, thereby affecting the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the haemocytes of bivalve molluscs (Viarengo et al., 1994).

In the present work, copper was found to significantly increase the phenoloxidase levels in the haemocytes of *H. rufescens* in a dose- and time-dependent manner, indicating that the copper toxicity causes effects on humoral immunity activity during the time of exposure to the trace metal. A similar effect on phenoloxidase was observed in *H. diversicolor* caused by the action of nitrites (Cheng et al., 2004<sub>e</sub>) and organic xenobiotic compounds (Gopalakrishnan et al., 2009), as well as in other molluscs upon exposure to copper and organic xenobiotic compounds (Coles et al., 1994; Thiagarajan et al., 2006). Phenoloxidase, a copper-dependent enzyme detected in the haemocytes and haemolymph that is part of the phenoloxidase cascade, plays a crucial role in the innate immunity of molluscs (Muñoz et al., 2006; Bryan-Walker et al., 2007). This enzyme has also been shown to catalyse the conversion of phenols into extremely reactive quinones, which in turn can be polymerized into melanin and used to produce different intermediary molecules with bactericidal properties (Coles and Pipe, 1994; Söderhäll and Cerenius, 1998). The melanisation process is involved in the encapsulation and

elimination of numerous foreign particles (Bryan-Walker et al., 2007). Nappi et al. (1995) reported that intermediary molecules produced by phenoloxidase may generate superoxide anions; therefore, it is probable that exposure to trace metals indirectly increases the levels of free radicals that can cause oxidative stress and cellular damage (Thiagarajan et al., 2006).

Indeed, our results show that a persistent increase in the generation of superoxide anions by abalone haemocytes was caused by copper exposure in a dose- and time-dependent manner. Phagocytic haemocytes normally suffer respiratory burst due to increased oxygen consumption and increased production of ROS, such as superoxide anions, which are cytotoxic and a vital cellular defence reaction in the mollusc immune responses (Hooper et al., 2007). ROS production by the haemocytes as a result of exposure to foreign particles is known to be controlled in part by NADPH oxidase. As an enzymatic complex localized in the membrane, NADPH oxidase catalyses the transformation of molecular oxygen into superoxide anions. Superoxide anions are subsequently transformed into hydrogen peroxide via the action of superoxide dismutase and later give rise to other ROS (Nappi and Ottaviani, 2000; Buggé et al., 2007) that can interact with biological macromolecules, leading to enzymatic inactivation, lipid peroxidation, DNA damage, cellular death, etc. (Cazenave et al., 2006). Our results agree with previous research observations that molluscs exposed to various concentrations of contaminating compounds showed increases in the generation of superoxides (Pipe et al., 1999; Thiagarajan et al., 2006; Gopalakrishnan et al., 2009; 2011).

In conclusion, haemocytes are important indicators of health and stress in invertebrates, because they play a crucial role in the differential immunity of these organisms. Our present study demonstrates that short-term exposure of post-weaned juvenile *H. rufescens* cultivated in a hatchery to low concentrations of copper can alter hemocytic parameters, including phagocytosis, phenoloxidase activity, and ROS production. Characterization of the functional mechanisms of these indicators is essential for understanding the effect of metal contamination on the hemolymphatic compartment responsible for the physiological integrity of these marine invertebrates, especially at a critical stage

of their ontogenic development. Overall, our results provide the informative basis for possible impacts of trace metals on abalone physiology, mainly in the coastal zones off northern Chile, which are affected mostly by copper as a result of mining activities. Since these regions are potential marine zones for the cultivation of this species, it is important to investigate whether the development of these organisms is affected in future marine concessions.

### Acknowledgements

This study was financed by FONDEF-CONICYT Chile (Project D05I10291). The authors are grateful to the aquaculture company Cultivos LiveSeafood S.A, Chile, who allowed the use of their facilities to carry out the experiments.

### References

- Aladaileh, S., Mohammad, M., Ferrari, B., Nair, S., Raftos, D., 2008. In vitro effects of noradrenaline on Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) haemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 151, 691-697.
- Bayne, C., 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. Phagocytosis appears to be an ancient line of defense. *Bioscience* 40, 723-731.
- Blanchard, J., Grosell, M., 2006. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish, *Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? *Aquatic Toxicology* 80, 131-139.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 2000. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* haemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology* 142, 145-156.
- Bryan-Walker, K., Leung, T., Poulin, R., 2007. Local adaptation of immunity against a trematode parasite in marine amphipod populations. *Marine Biology* 152, 687-695.
- Buggé, D., Hégaret, H., Wikfors, G., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 188-196.
- Carvalho, C., Fernandes, M., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 151, 437-442.
- Cazenave, J., Bistoni, M., Pesce, S., Wunderlin, D., 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin RR. *Aquatic Toxicology* 76, 1-12.
- Cheng, T., Sullivan, J., 1984. Effects of heavy metals on the phagocytosis by molluscan haemocytes. *Marine Environmental Research* 14, 305-315.
- Cheng, T., 1988<sub>a</sub>. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: Total and differential cell counts. *Journal of Invertebrate Pathology* 51, 207-214.
- Cheng, T., 1988<sub>b</sub>. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytic and endocytic indices. *Journal of Invertebrate Pathology* 51, 215-220.

- Cheng, W., Hsiao, I., Hsu, C., Chen, J., 2004<sub>a</sub>. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish and Shellfish Immunology 17(3), 235-243.
- Cheng, W., Juang, F., Chen, J., 2004<sub>b</sub>. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity. Fish and Shellfish Immunology 16, 295-306.
- Cheng, W., Li, C., Chen, J., 2004<sub>c</sub>. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture 232, 103-115.
- Cheng, W., Hsiao, I., Chen, J., 2004<sub>d</sub>. Effect of ammonia on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish and Shellfish Immunology 17, 193-202.
- Cheng, W., Hsiao, I., Chen, J., 2004<sub>e</sub>. Effect of nitrite on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Diseases of Aquatic Organisms 60, 157-164.
- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., Burighel, P., 1998. Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. Ecotoxicology and Environmental Safety 40, 160-165.
- Coles, J., Pipe, P., 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis*. Fish and Shellfish Immunology 4, 337-52.
- Couture, P., Kumar, P., 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). Aquatic Toxicology 64, 107-120.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. FEBS 272, 5635-5652.
- Enríquez, R., Villagrán, R., 2008. La experiencia del desarrollo del cultivo de abalón (*Haliotis spp*) en Chile: oportunidades y desafíos. Revue Scientifique et Technique 27, 103-112.
- Flores-Aguilar, R., Gutiérrez, A., Ellwanger, A., Searcy-Bernal, R., 2007. Development and current status of abalone aquaculture in Chile. Journal of Shellfish Research 26 (3), 705-711.
- Gomez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I., Cajavaville, M., 2002. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzoapyrene. Marine Environmental Research 54, 431-436.
- Gopalakrishanan, S., Thilagam, H., Huang, W., Wang, K., 2009. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo[a]pyrene. Chemosphere 75, 389-397.
- Gopalakrishanan, S., Huang, W., Wang, Q., Wu, M., Liu, J., Wang, K., 2011. Effects of tributyltin and benzo[a]pyrene on the immune-associated activities of haemocytes and recovery responses in the gastropod abalone, *Haliotis diversicolor*. Comparative Biochemistry and Physiology C 154, 120-128.
- Gorski, J., Nugegoda, D., 2006. Toxicity of trace metals to juvenile abalone, *Haliotis rubra* following short term exposure. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 77(5), 732-740.
- Handler, J., Carson, J., Donachie, L., Gabor, L., Taylor, D., 2005. Bacterial Infection in Tasmanian Farmed Abalone: Causes, Pathology, Farm Factors and Control Options. Diseases in Asian Aquaculture Walker, P., Lester, R., Bondad-Reantaso, M., (eds). Fish Health Section.
- Hannan, M., Bamber, S., Moody, J., Galloway, T., Jones, M., 2009. Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. Aquatic Toxicology 92, 187-194.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handler, J., Benkendorff, K., 2007. Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. Fish and Shellfish Immunology 22, 363-379.
- Ittoop, G., George, K., George, R., Sobhana, K., Sanil, N., Nisha, P., 2009. Effect of copper toxicity on the hemolymph factors on the Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). Indian Journal of Fisheries 56 (4), 301-306.
- Jyothirmayi, G., Rao, P., 1987. Diagnostic value of haemolymph enzyme activity profile in infected snail *Lymnaea lutiola* (Lamarck). Indian Journal of Experimental Biology 25, 132-134.

- Klebanoff, S., 1982. Oxygen-dependant cytotoxic mechanisms of phagocytes. In: Gallin J., Fauci, A., (eds). *Advances in host defence mechanisms 1*. New York: Raven Press.
- Lall, S., 2002. The minerals. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, pp. 259–308.
- Lauer, M., de Oliveira, C., Inocencio, N., Bianchini, A., 2012. Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 156, 140-147.
- Lotze, H., Lenihan, H., Bourque, B., Bradbury, R., Cooke, M., Kay, M., Kidwell, S., Kirby, M., Peterson, C., Jackson, J., 2006. Depletion, Degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science* 312, 1806-1809.
- Manyin, T., Rowe, C.L., 2009. Bioenergetic effects of aqueous copper and cadmium on the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 150, 65-71.
- Malham, S., Lactose, A., Gélébart, F., Cuff, A., Poulet, S., 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusk *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology Part A* 295, 136-144.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D., Marin, M., 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of haemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Marine Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 163-170.
- Mori, I., Schroeder, J., 2004. Reactive Oxygen Species Activation of Plant  $\text{Ca}^{+2}$  Channels. A Signaling Mechanism in polar Growth, Hormone transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. *Plant Physiology* 135: 702-708.
- Muñoz, P., Meseguer, J., Esteban, M., 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 12-19.
- Nappi, A., Vass, E., Frey, F., Carton, Y., (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology* 68, 450-456.
- Nappi, A., Ottaviani, E., 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* 22, 469-480.
- Pinho, G., Pedroso, M., Rodrigues, S., Souza, S., Bianchini, A., 2007. Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquatic Toxicology* 84, 62–70.
- Piola, R., Johnston, E., 2006. Differential resistance to extended copper exposure in four introduced bryozoans. *Marine Ecology Progress Series* 311, 103-114.
- Pipe, R., Coles, J., Carissan, F., Ramanathan, K., 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 46: 43-54.
- Raven, J., Evans, M., Korb, R., 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in  $\text{O}_2$ -evolving organism. *Photosynthesis Research* 60: 111-149.
- Riedel, G., 2008. Copper. *Ecotoxicology* 17, 778-783.
- Rubino, J., Franz, K., 2012. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry* 107, 129-143.
- Salamanca, M.A., Camano, A., Jara, B., 2000. Distribucion de Cu, Pb y Zn en aguas costeras de bahia San Jorge en el Norte de Chile. *Gayana* 64 (2), 195-204.
- Salamanca, M., Jara, B., Rodríguez, T., 2004. Niveles de Cu, Pb y Zn en aguas y *Perumytilus purpuratus* en Bahía San Jorge, norte de Chile. *Gayana* 68, 53-62.
- Salviati, L., Hernandez-Rosa, E., Walker, W., Sacconi, S., DiMauro, S., Schon, E., Davidson, M., (2002). Copper supplementation restores cytochrome c oxidase activity in cultured cells from patients with  $\text{SCO}_2$  mutations. *Journal of Biochemistry* 136, 321-327.
- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sendcal, L., Goudreau, P., Fournier, M., 2002. Phagocytosis activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of haemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58, 189-200.



- Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y., Miura, Y., 2007. Mass mortalities of Japanese abalone *Haliotis diversicolor supertexta* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes and Environment* 22(3), 300-308.
- Scelzo, M., 1997. Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Investigaciones Marinas* 25, 177-185.
- Silva-Aciaras, F., Zapata, M., Tournois, J., Moraga, D., Riquelme, C., 2011. Identification of genes expressed in juvenile *Haliotis rufescens* in response to different copper concentrations in the north of Chile under controlled conditions. *Marine Pollution Bulletin* 62, 2671-2680.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., Johansson, M., 1996. The prophenoloxidase activation system in invertebrates. In: Söderhäll, K., Iwanawa, S., Vasta, G (eds). *New directions in invertebrate immunology*. Fair Haven, N: SOS publications. p.229-253.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 23-28.
- Thiagarajan, R., Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., 2006. Immunomodulation in the Marine green Mussel *Perna viridis* exposed to Sub-Lethal Concentrations of Cu and Hg. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 392-399.
- Valdés, J., Román, D., Rivera, L., Ávila, J., Cortés, P., 2011. Metal contents in coastal waters of San Jorge Bay, Antofagasta, northern Chile: a base line for establishing seawater quality guidelines. *Environmental Monitoring and Assessment* 183, 231-242.
- Viana, A., 2002. Avances en la nutrición, fisiología digestiva y metabolismo del abulón. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortes, M.G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memórias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, Mexico, pp. 1-16.
- Viant, M., Walton, J., Tenbrook, P., Tjeerdema, R., 2002. Sublethal action of copper in abalone (*Haliotis rufescens*) as characterized by in vivo <sup>31</sup>P NMR. *Aquatic Toxicology* 57, 139-151.
- Viarengo, A., Nicotera, P., 1991. Possible role of Ca<sup>2+</sup> in heavy metal cytotoxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 100, 81-84.
- Viarengo, A., Canesi, L., Moore, M., Orunesu, M., 1994. Effects of Hg<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on the cytosolic Ca<sup>2+</sup> level in molluscan blood cells evaluated by confocal microscopy and spectrofluorimetry. *Marine Biology* 119, 557-564.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Burlando, B., Canesi, L., Orunesu, M., 1996. In vivo effects of copper on the calcium homeostasis mechanisms of mussels gill cells plasma membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 113, 421-425.
- Vosloo, D., Sara, J., Vosloo, A., (2012). Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses. *Aquatic Toxicology* 106-107: 1- 8.
- White, S., Rainbow, R., 1985. On the metabolic requirements for copper and zinc in mollusk and crustacean. *Marine Environmental Research* 16, 215-229.
- Won, E., Rhee, J., Kim, R., Ra, K., Kim, K., Shin, K., Lee, J., 2012. Susceptibility to oxidative stress and modulated expression of antioxidant genes in the copper-exposed polychaete *Perinereis nuntia*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 155 344-351.
- Zapata, M., Tanguy, A., David, E., Moraga, D., Riquelme, C., 2009. Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. *Gene* 442, 37-46.
- Zhou, J., Cai, Z., Zhu, X., Li, L., Gao, Y., 2010. Innate immune parameters and haemolymph protein expression profile to evaluate the immunotoxicity of tributyltin on abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Developmental and Comparative Immunology*

## Conclusion sur le chapitre II-B

Les cellules hémyocytaires des ormeaux et en général chez les mollusques marins sont des indicateurs importants de la santé des organismes et de l'impact des paramètres physico-chimiques et anthropiques de l'environnement. Elles jouent un rôle crucial dans l'immunité différentielle des organismes. Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent qu'une exposition à court terme à faibles et fortes concentrations en cuivre peut modifier les paramètres hémyocytaires des juvéniles de cet organisme. Dans ce contexte, nos expériences sont focalisées sur les paramètres immunitaires tels que les hémyocytes circulant totaux (HCT), la phagocytose, l'activité de la phénoloxydase, et la production d'espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde). Ces indicateurs sont essentiels pour comprendre l'effet de la pollution métallique dans le compartiment hémolympatique responsable de l'intégrité physiologique de ces invertébrés marins, en particulier dans une phase critique du développement ontogénétique de ces organismes (sevrage). Cette étude a permis d'émettre un certain nombre d'hypothèses de travail sur l'effet du cuivre dans l'immunomodulation de ces organismes. L'exposition au cuivre a provoqué une importante diminution dose et temps-dépendant des HCT et de la phagocytose. Cette diminution des cellules circulantes dose et temps-dépendant peut s'expliquer par les mortalités différentielles des hémyocytes, et par la migration de ces cellules vers des zones de tissu sujettes aux dommages causés par le cuivre. Cette étude montre également que le cuivre peut augmenter de manière significative l'activité de la phénoloxydase (PO) et l'anion superoxyde. La reconnaissance du contaminant par l'organisme comme une source de stress ou comme une molécule du non-soi provoquerait une activation des mécanismes de défense immunitaire. De cette façon, la mesure de l'activité PO pourrait permettre de détecter une activation anormale du système de défense immunitaire. L'utilisation des POs comme biomarqueur de stress environnemental permettrait donc de détecter une situation de stress avant que celle-ci ne provoque un impact grave sur l'organisme. D'autre part, il est probable que les niveaux d'exposition au cuivre augmentent indirectement les radicaux libres qui peuvent causer du stress oxydatif. Par ailleurs, la séquestration de cuivre par les systèmes de détoxication peut conduire à une production importante de radicaux libres, provoquant

par conséquent l'activation d'enzymes antioxydantes, pour le maintien de l'homéostasie au sein de l'organisme. Les hémocytes phagocytaires normalement souffrent de la flambée oxydatif en raison de l'augmentation de la consommation d'oxygène et la production de ROS tel que l'anion superoxyde, une molécule cytotoxique essentielle dans la réponse immunitaire chez les mollusques.

Les résultats obtenus dans le compartiment hemolymphatique et en particulier au niveau des hémocytes fournissent des renseignements sur le dysfonctionnement physiologique (mortalités différentielles, activités phenoloxidase, production des ROS....) provoqué par le stress métallique. Ce type de résultats est d'une importance capitale pour comprendre la stratégie adaptative et physiologique de ces organismes au niveau cellulaire face à ce métal. Des recherches complémentaires à long terme sont nécessaires pour mieux comprendre les réponses des mécanismes d'immunomodulation des ormeaux face aux facteurs du milieu. Des études de transcriptomie et de physiologie intégrative sont capitales pour pouvoir anticiper d'éventuelles mortalités dans cet écosystème fortement impacté par le cuivre.

# **Chapitre III : Réponse transcriptomique et cellulaire face aux stress des microorganismes pathogènes et en présence de probiotiques.**

## 1. Contexte et introduction à l'étude

Les vibrioses sont les principaux problèmes rencontrés dans les élevages d'invertébrés marins provoquant des événements pandémiques en milieu contrôlé et dans le milieu naturel (Paillard et al., 2004<sub>a</sub>; Leyton & Riquelme, 2008; Beaz-Hidalgo et al., 2010). La bactérie, *Vibrio parahaemolyticus* est hautement pathogène et provoque des mortalités massives des larves, post larves et juvéniles pour la plus part des espèces d'ormeaux : *Haliotis diversicolor supertexta* (Liu et al., 2000; Cheng et al., 2004a), *Haliotis discus discus* (De Zoysa et al., 2011; Huang et al., 2001; Cai et al., 2007) et *H. rufescens* (Elston & Lockwood, 1983). Cette bactérie affecte aussi la santé humaine. Ainsi, le Chili a connu trois événements d'intoxication alimentaire causée par la présence de *V. parahaemolyticus* chez les mollusques, les poissons et les crustacés d'importance commerciale. L'intoxication de la population se produit lorsque ces produits sont consommés à l'état cru ou pas assez cuits (De Paola et al., 2000; Fuenzalida et al., 2007; Harth et al., 2009).

L'utilisation des microorganismes probiotiques en aquaculture s'est avérée efficace en améliorant la résistance aux maladies, la nutrition et/ou la croissance des organismes cultivés (Irianto & Austin, 2002). Dans ce contexte, plusieurs travaux ont décrit l'utilisation de ces microorganismes dans l'élevage de poissons (Merrifield et al., 2010), de crustacés (Liu et al., 2010) et de mollusques (Macey & Coyne, 2005; 2006; Silva et al., 2011<sub>a</sub>). Actuellement, les chercheurs ont développé et intensifié les études relatives à l'isolement et à l'application des bactéries probiotiques dans la culture de l'ormeau (Ten Doeschate & Coyne, 2008; Iehata et al., 2010; Silva et al., 2011<sub>a</sub>). Ainsi, il a été démontré que les probiotiques sont efficaces sur un grand nombre d'espèces marines pour favoriser la croissance, l'amélioration nutritionnelle, l'immunité et la survie (Mahlham et al., 2003; Macey & Coyne, 2005).

Dans le contexte de l'augmentation des niveaux de stress des organismes dans les écosystèmes marins, il est nécessaire de comprendre les réponses cellulaires, moléculaires et génétiques mises en place par les organismes afin de maintenir l'homéostasie dans de tels milieux. Il est reconnu que la présence des microorganismes pathogènes avec d'autres facteurs de l'environnement sont la source

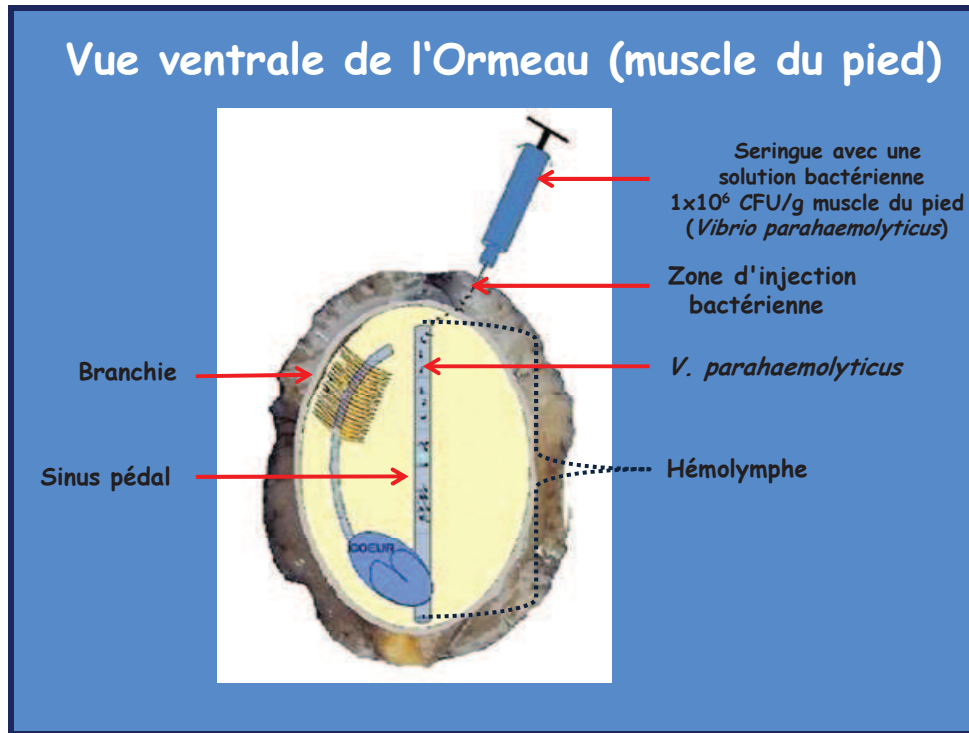


majeure de dysfonctionnement cellulaire et des troubles de la survie des organismes. Dans ce contexte, des études transcriptomiques et physiologiques ont été réalisées avec succès pour caractériser les bases moléculaires et cellulaires de la sensibilité aux agents pathogènes (vibrions) et ils ont montré qu'une contamination bactérienne peut altérer la physiologie des larves, des juvéniles et des adultes d'ormeau (Wang et al., 2008<sub>a</sub>; Travers et al., 2010; De Zoysa et al., 2011). Ces différents dysfonctionnements provoqués par ces microorganismes peuvent être contrôlés par l'action de probiotiques. En effet, dans le domaine transcriptomique et immunologique, différents travaux ont démontré une amélioration de la survie et de la croissance des organismes en condition d'élevage avec une nourriture additionnée de probiotiques (Macey & Coyne., 2005; Aly et al., 2008; Tseng et al., 2009; Hai et al., 2009; Liu et al., 2010; Panigrahi et al., 2011). Cependant, l'effet du stress bactérien par *V. parahaemolyticus* sur la physiologie et la transcriptomique de *H. rufescens* nourri avec une alimentation additionnée de bactéries probiotiques n'a pas été documenté à ce jour.

Dans ce contexte, une exploration sur l'impact à court terme sur l'homéostasie cellulaire et la physiologie de l'infection bactérienne par *V. parahaemolyticus* chez les juvéniles de *H. rufescens* a été réalisée pendant la phase physiologique critique des juvéniles (sevrage). Notons que pendant cette phase les jeunes ormeaux ont été soumis à une alimentation avec ou sans probiotiques.

Pendant cette étape expérimentale nous avons étudié la régulation de l'expression de gènes candidats obtenus par de banques soustractives et/ou disponibles dans les banques génomiques de gastéropodes afin d'étudier l'impact de l'infection bactérienne et l'action de probiotiques sur la cinétique d'expression génique. L'analyse transcriptomique des organismes a été réalisée à partir des ARNs extraits du muscle du pied qui est un organe de la locomotion et peut atteindre 40% du poids total de l'animal. Il est, de plus, traversé par l'hémolymphe qui est le fluide circulatoire des invertébrés qui contient des cellules hématocytaires assurant notamment la fonction de défense immunitaire. Par ailleurs, les signes macroscopiques d'infection par la vibriose se développent au niveau du muscle pédieux de l'ormeau (Travers et al., 2010). Dans nos expériences, nous avons identifié et quantifié la

présence de *V. parahaemolyticus* dans le muscle de l'animal (précédemment infecté par la bactérie - Figure 17) à l'aide des techniques microbiologiques de quantification des bactéries en milieux nutritifs solides.



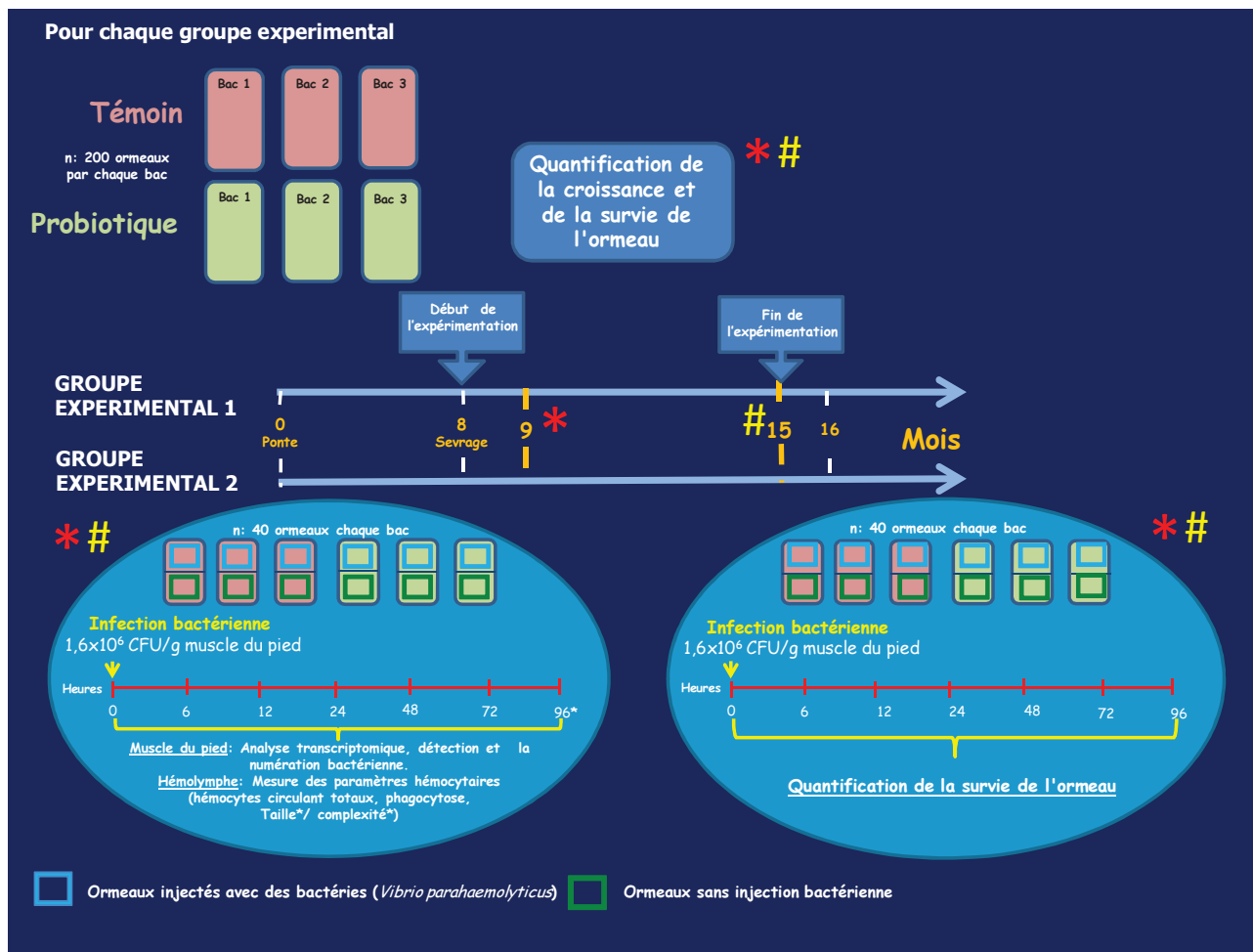
**Figure 17.** Schéma représentant l'infection bactérienne expérimentale chez l'Ormeau *H. rufescens*.

La cinétique d'expression génique par PCR en temps réel a été réalisée sur différents transcrits associés à différentes fonctions physiologiques majeures des individus : Métabolisme général et énergétique (Les gènes codant pour l'ATP synthase, et alginase), Respiration cellulaire (Les gènes codant pour les sous-unités I et III de la cytochrome, sous-unités IV de la NADH déshydrogénase), développement et différenciation (Le gène codant pour le developmentally-regulated vdg3 et la VM2), cytosquelette (Le gène codant pour le calponine et collagène), réponse au stress (Les gènes codant pour les protéines associées à la sénescence, Ferritine, Laminin et Hsp40), communication cellulaire (Le gène codant pour la Lipoprotéine Receptor 1- LPr1) et l'immunité (Les gènes codant pour la macrophage expressed protein MEP et Caspase 8). En outre, nous avons appliqué des techniques immunologiques en microscopie (hémocytes circulants totaux et phagocytose) et de cytométrie en flux (taille, complexité et concentration d'hémocytes) de manière à caractériser les

réponses cellulaires d'hémocytes d'ormeaux en condition d'infection bactérienne et en présence d'alimentation avec ou sans probiotique.

L'étude trancriptomique et cellulaire des organismes est indispensable pour décrypter les processus d'adaptation et de défense pouvant être activés suite à l'exposition au pathogène et pouvoir établir les caractères de résistance et de sensibilité des animaux à l'impact des bactéries pathogènes en interaction avec des microorganismes probiotiques dans les écosystèmes potentiellement impactés par *V. parahaemolyticus*. Il faut rappeler que la culture de *H. rufescens* au Chili a lieu dans des zones maritimes qui ont présenté des événements naturels de fortes concentrations de bactéries pathogènes d'où l'importance des études moléculaires et cellulaires exploratoires sur la survie, le développement, la croissance et le maintien des animaux en écloserie industrielle.

L'approche expérimentale de ces différentes manipulations est représentée dans la figure 18.



**Figure 18.** Schéma résumant la démarche technique appliquée dans cette étude : Les rectangles marron représentent les bacs témoins et les rectangles vert clair représentent les bacs avec probiotiques en triplicats. Les cercles bleus résument les challenges bactériens et l'évaluation des différents paramètres biologiques retenus. \* Analyse réalisée 9 mois après la ponte. # Analyse réalisée 15 mois après la ponte.

Les différents résultats obtenus dans cette partie sont présentés dans l'article intitulé :

*Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*) in farmed juvenile *Haliotis rufescens* fed with or without probiotic diet. Publié dans *Journal of Invertebrate Pathology* 113 (2013) pages 163-173.*





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jip](http://www.elsevier.com/locate/jip)

## Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*) in farmed juvenile *Haliotis rufescens* fed with or without probiotic diet

Fernando Silva-Aciare<sup>a,b,\*</sup>, Dario Moraga<sup>b</sup>, Michel Auffret<sup>b</sup>, Arnaud Tanguy<sup>c,d</sup>, Carlos Riquelme<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad de Antofagasta, 170 Antofagasta, Chile

<sup>b</sup> UMR CNRS 6539, IEMAR (Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin), IUEM (Institut Universitaire Européen de la Mer), Université de Bretagne Occidentale, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

<sup>c</sup> UMR CNRS 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France

<sup>d</sup> UPMC Université Paris 06, UMR 7144, Equipe Génétique et Adaptation en Milieu Extrême, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 August 2012

Accepted 12 March 2013

Available online 25 March 2013

#### Keywords:

*Haliotis rufescens*

*Vibrio parahaemolyticus*

Probiotics

Gene expression

Immunological status

Bacterial challenge

### ABSTRACT

The abalone production in Chile has increased considerably in recent years with no sign of tapering off. Open and semi-closed circuits in the marine water zones in the north and south of Chile are the preferred areas of culture. Coastal ecosystems are subjected to a wide variety of contaminants that generate stress that affects populations via their impacts to individuals at both physiological and genetic levels. This work investigated the genomic and cellular response of post-weaning juvenile *Haliotis rufescens* abalone under hatchery conditions, fed with probiotic diets, and subsequently challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. The expression patterns of 16 selected genes associated with different metabolic pathways were analyzed using Real-Time PCR. Gene expression was then compared to immunological response parameters in the abalone and quantification of *V. parahaemolyticus* during the experimental period. Both transcriptomic and immunological analyses indicated significant alteration of physiological processes in *H. rufescens* correlated to exposure to the pathogenic bacteria, as well as to probiotic nutrition.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Abalone is a slow-growing herbivorous marine mollusk of great economic importance in many countries (Viana, 2002). Larval development under culture conditions lasts from 4 to 15 days at a temperature of 16 °C before larvae settlement when metamorphosis takes place, stimulated by coralline microalgae and benthic diatoms during their substrate exploration phase (Leighton, 2000). Development of the buccal apparatus in the post-larvae initiates exogenous feeding which consists mainly of benthic diatoms, bacteria, filamentous algae, and organic matter found around the substrate (Hahn, 1989; Leighton, 2000).

Post-larval development ends with the appearance of the first respiratory pore around day 50 post-set, and the juvenile stage begins; the shell is about 2-mm in length (Leighton, 2000). One of the critical biological stages of this species is their so-called "weaning," which is when they transition from food acquired from diatom biofilms to macroalgae, and it is the stage in which the highest mortality occurs, exceeding 30–40% (Flores-Aguilar et al., 2007). This

weaning period starts 3–8 months after fertilization and begins with feeding on macroalgae plantlets (Leighton, 2000; Silva-Aciare et al., 2011a). Different studies show the clear dependence of digestive enzyme activity on bacteria and the need of an exoenzymatic activity to improve the digestibility of micro- and macroalgae in the weaning stage which leads to a considerable increase in their growth rate (Sawabe et al., 2003; Takami and Kawamura, 2003; Macey and Coyne, 2005; Daume, 2006).

Infectious diseases, especially from *Vibrio*, are considered one of the main barriers to increased production in mollusk culture in terms of quantity, quality and regularity (Moore et al., 2000; Leyton and Riquelme, 2008; Beaz-Hidalgo et al., 2010). Among them, *Vibrio parahaemolyticus* (Vp), a Gram-negative  $\gamma$ -proteobacterium that can colonize and become pathogenic to a large number of marine hosts, as well as humans, has been well studied (Pruzzo et al., 2005; Thompson et al., 2006; Cai et al., 2007; Yang et al., 2009; Han et al., 2010; Lopez-Joven et al., 2011). Vp is known to be one of the major causes of pandemic seafood-borne human gastroenteritis (Aberoumand, 2010). This contamination can cause pandemic episodes, human mortalities, huge economic losses, and social crises in industrial aquaculture areas where these marine resources are fished and processed (Leyton and Riquelme, 2008). In Chile, three major events of food poisoning due to the

\* Corresponding author at: Laboratorio de Ecología Microbiana, Universidad de Antofagasta, 170 Antofagasta, Chile. Fax: +56 55 637804.

E-mail address: [fsacaires@uantof.cl](mailto:fsacaires@uantof.cl) (F. Silva-Aciare).



ingestion of raw or undercooked mollusks, fish and crustaceans infected with *Vp* have been reported in the last two decades, 1998 in Antofagasta with 300 cases, and 2004–2007 in Puerto Montt with more than 7000 cases (Fuenzalida et al., 2007; Harth et al., 2009). In the specific case of abalone, *Vp* is highly pathogenic for the species *Haliotis diversicolor supertexta* (Liu et al., 2000; Cheng et al., 2004), *Haliotis discus discus* (De Zoysa et al., 2011) and *Haliotis rufescens* (Elston and Lockwood, 1983), affecting the larval, post-larval and small juvenile stages (Huang et al., 2001; Cai et al., 2007).

The use of probiotic bacteria for the prevention of disease and improvement of nutrition in aquaculture is becoming a need due to the increased demand for environmentally friendly aquaculture (Irianto and Austin, 2002). In this context various publications have described the use of these microorganisms in the culture of fish (Merrifield et al., 2010), crustaceans (Liu et al., 2010) and mollusks (Macey and Coyne, 2005, 2006; Silva-Aci res et al., 2011a). Recently, studies that aimed at isolating and applying probiotic bacteria in the culture of abalone have shown that probiotics are effective for promoting growth, and improving nutrition, immunity, and survival (Ten Doeschate and Coyne, 2008; Iehata et al., 2010; Silva-Aci res et al., 2011a). Probiotics included in the diet of abalones also improved their immunological status, leading to increased survival (Macey and Coyne, 2005).

It is well known that bacterial stress factors constitute a major source of cellular dysfunction that impacts survival in invertebrates. Global genomic studies have been used to characterize the molecular basis of susceptibility to pathogenic *Vibrio* species, and have shown that this kind of contamination can alter the key metabolic pathways of the larvae, juveniles and adults of commercially important abalone species (Wang et al., 2008a; Travers et al., 2010; De Zoysa et al., 2011). However, the effects of bacterial stress (by *Vp*) on the physiology and genomics of *H. rufescens* fed with a macroalgal diet preconditioned with probiotic bacteria has not been documented.

This study looked at the genomic and cellular response of weaned *H. rufescens* juveniles at a critical period in their culture (1 and 7 months post-weaning) in controlled conditions, fed probiotic diets and then challenged with *V. parahaemolyticus*. For that purpose, 16 genes associated with various metabolic pathways from subtractive libraries (SSH) of *H. rufescens* (Silva-Aci res et al., 2011b; Mah et al., 2004), *H. diversicolor* (Wang et al., 2008a) and *Haliotis tuberculata* (Travers et al., 2010) were selected. Gene expression was analyzed using quantitative PCR and compared with quantifications of *V. parahaemolyticus*, and the growth, survival and immunological status of abalone during the experimental period.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Probiotic strains, *V. parahaemolyticus*, and culture medium

The probiotic strains used in this study, *Agarivorans albus* strain F1-UMA (GenBank accession number GQ861540) and *Vibrio* sp. Strain F15-UMA (GenBank accession number GQ861541), were selected because of their ability to degrade carbohydrates, proteins and lipids present in the abalone diet, while the bacteria *Vibrio* sp. Strain C21-UMA (GenBank accession number GQ861538) was chosen for its alginolytic activity and ability to inhibit the growth of the pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* (Silva-Aci res et al., 2011a). These three probiotic strains were cultivated in Tryptone Soy Broth (TSB OXOID) culture medium supplemented with 0.1% (w/v) sodium alginate, 0.05% (w/v) bacteriological agar, and 2% (w/v) NaCl kept in Tryptone Soy Agar (TSA, OXOID) supplemented with 2% (w/v) NaCl at a temperature of

20 °C. The appearance of clearness around the colonies (C21-UMA and F15-UMA) cultured in TSA with 1.5% sodium alginate was indicative of alginolytic activity (Hisano et al., 1994). Liquefaction or softening of the agar around the colonies (F1-UMA) was indicative of agarolytic activity.

The pathogenic bacterium *V. parahaemolyticus* strain PM48.5 (Leyton and Riquelme, 2010) used in this study was cultivated in Petri dishes with CHROMagar vibrio® 2.0% NaCl culture medium, in which they produce violet colored colonies. The dishes were incubated at 20 °C. All the strains were then cryopreserved at –20 °C.

### 2.2. Animals

The abalones were obtained from Cultivos LiveSeafood Chile S.A (29°56'S, 71°20'W), and kept at the company's facilities in 65.98-L polyethylene tanks (0.73 × 0.35 × 0.27 m<sup>3</sup>) with a continuous seawater flow filtered at 10 µm and kept at 16–19 °C, with constant air supply, and fed with macroalgae (*Macrocystis pyrifera* and *Lessonia nigrescens*).

### 2.3. Growth and survival tests

The experiment started with recently weaned abalone (8 months post fertilization) with an initial length of 16 ± 0.5 mm and weight of 0.71 ± 0.03 g. The abalones were distributed on two plastic mesh trays (0.28 × 0.28 × 0.18 m) in each tank at an initial density of 100 abalones/tray (200 abalones/tank). Three of the tanks were fed macroalgae (*M. pyrifera* and *L. nigrescens*) without probiotic supplement and three with macroalgae colonized with probiotic bacteria. Each tank was fed three times per week at 25% of the total weight of its abalones. The duration of the experiment was 7 months. The weight, length and survival of all the animals in the experiments were recorded at 1 and 7 months after the experiment began, i.e., months 1 and 7 post-weaning. At each measuring event, a sample was removed to challenge with *V. parahaemolyticus*. The preconditioning of macroalgal fronds with the probiotic bacteria was made according to the method described by Silva-Aci res et al. (2011a).

### 2.4. Bacterial challenge

Two experiments were done using the abalone stock described in 2.3, which had been fed macroalgae with and without probiotic supplement since the weaning period (8 months after fertilization). The first group involved 9-month old individuals (1 month post-weaning) (19 ± 0.5 mm, 0.81 ± 0.04 g) and the second group involved 15-month old individuals (7 months post-weaning) (40 ± 0.3 mm, 12 ± 0.80 g). Another set of six 65.98-L polyethylene tanks was utilized with the same conditions of culture described above. In each tank, the abalones were distributed on two plastic mesh trays with 16 abalones/tray. Three tanks contained animals fed with macroalgae without probiotic supplement (control treatment) and the other three tanks contained animals fed with macroalgae colonized with probiotic bacteria (probiotic treatment). All of the individuals from one of the two trays in each tank were inoculated in the front part of the foot with 50 µL of bacteria solution, corresponding to a dose of 1 × 10<sup>6</sup> CFU (colony forming units) of *V. parahaemolyticus*/g of soft weight of the abalones. Bacteria dosage was based on previous experiments (unpublished data), applying the criterion of the LD<sub>50</sub> value according to the Trimmed Spearman–K rber method (Hamilton et al., 1977). The control individuals on the remaining tray, not challenged by the bacterial pathogen, were inoculated with an equal volume of sterile saline solution (0.85% NaCl). Extractions of the foot muscle for transcriptomic analysis, *V. parahaemolyticus* counting and hemolymph



collection for immunological parameters analysis were performed at post-inoculation times of  $T = 0, 6, 12, 24, 48, 72$  and  $96$  h, in triplicate, from both the challenge and control animals. Concurrently, in another set-up with the same culture and treatment conditions, 20 abalones/tray were added to determine the percentage survival of the animals over the whole experimental period.

#### 2.5. Sample extraction for genomic analysis and counting of *V. parahaemolyticus*

At the sampling times mentioned in 2.4, abalones were dissected under sterile conditions after first removing mucus cells from the basal and lateral zones of the organism. The foot muscles were partially extracted (at the hemolymphatic sinus level), kept in sterile plastic tubes with RNALater™ (Ambion), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for future RNA extraction. At the same time, tissue from the same extraction zone was used for bacterial analysis. The dissected samples were homogenized with a Tissue Tearor™ in sterile saline solution on ice, then placed in separate sterile polyethylene bags (Seward Medical) with 15 mL of sterile potassium phosphate buffer  $0.1\text{ M}$ , pH 6.9. Finally, the product was mixed in a stomacher (Lab Blender 80) for 3 min. The homogenates were diluted serially in tubes with 9 mL of sterile saline solution. Then  $0.1\text{ mL}$  of these dilutions were seeded in Petri dishes with CHROMagar vibrio® 2.0% NaCl culture medium, in which *Vibrio* colonies present as violet colored. The Petri dishes were incubated for 48 h at  $25^{\circ}\text{C}$  and the bacterial colonies were numbered and tabulated as CFU per gram of foot muscle.

#### 2.6. Extraction of RNA, synthesis of cDNA and verification of presence or absence of amplified PCR products by conventional polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA was extracted from the foot muscle of the abalones with and without bacterial challenge at  $T = 0, 6, 12, 24, 48, 72$  and  $96$  h in biological triplicates (3 abalones at each sampled time), using  $1\text{ mL}$  of TRIzol® Reagent (Invitrogen) per  $50\text{ mg}$  of tissue. The extracted muscle was homogenized with a Tissue Tearor™ in ice, total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions, and resuspended in RNase-free water. The quality of the RNA was evaluated with an Agilent Bioanalyzer 2100 and RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) following the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured with a NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and the samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until their use. The reverse transcription to obtain the cDNA was carried out with a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions on  $1\text{ }\mu\text{g}$  of total RNA using random hexamer primers to start the reaction. In order to demonstrate the presence or absence of DNA in samples and verify a single product was obtained for all reactions, we have performed a PCR. The sequences of the oligonucleotide primers used to amplify the specific genes of the products and their GenBank accession numbers are shown in Table 1. For the detection of *V. parahaemolyticus*, two genes were used: the *tdh+* gene that encode for the thermostable direct hemolysin (GenBank accession number D90101, forward primer: 5'-AAACATCTGCTTTTGTAGCTTCCA-3'; reverse primer: 5'-CTCGAACAAACAATATCT CATCAG-3'), and the gene *GyrB* that encodes the B subunit protein of DNA gyrase, (GenBank accession number AY527390; forward primer: 5'-TGAAGGT-TTGACTGCCGTTGT-3'; reverse primer 5'-TGGGTTTTTCGACCAAGAAGTCA-3').

All PCR-amplifications were performed in  $25\text{ }\mu\text{L}$  reactions containing buffer ( $2\text{ mM MgCl}_2$ ),  $1\times$  Taq polymerase buffer, dNTPs ( $40\text{ }\mu\text{M}$ ), primers ( $0.2\text{ }\mu\text{M}$  of each),  $0.5$  unit of Taq Uptitherm DNA polymerase (Interchim, Montluçon, France), first strand cDNA sample ( $1\text{ }\mu\text{L}$  dilution  $1/10$ ), and water (RNase- and DNA-

ase-free). After an initial pre-cycle (denaturation  $5\text{ min}$  at  $94^{\circ}\text{C}$ , first annealing for  $2\text{ min}$  at  $55^{\circ}\text{C}$ , elongation  $1\text{ min }30\text{ s}$  at  $72^{\circ}\text{C}$ ), 35 amplification cycles were performed as follows:  $20\text{ s}$  at  $94^{\circ}\text{C}$ ,  $40\text{ s}$  at  $55^{\circ}\text{C}$ ,  $1\text{ min }30\text{ s}$  at  $72^{\circ}\text{C}$ , with a final elongation  $10\text{ min}$  at  $72^{\circ}\text{C}$ . Specific detection of amplified PCR products were further confirmed electrophoretically on agarose gel ( $1.5\%$ ) stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

#### 2.7. Validation of the differential gene expression and detection of *V. parahaemolyticus* by quantitative real time PCR (Q-PCR)

The differential expression of 13 genes selected from suppression subtractive hybridization (SSH) libraries of *H. rufescens* (Silva-Aciades et al., 2011b; Mah et al., 2004), 2 genes from the SSH of *H. diversicolor* (Wang et al., 2008a, 2008b), and 1 gene from the SSH of *H. tuberculata* (Travers et al., 2010) were validated using Quantitative Real Time PCR (Q-PCR) in biological triplicate with  $4.86\text{ }\mu\text{L}$  of cDNA ( $1/10$  dilution) in a total volume of  $10\text{ }\mu\text{L}$ , which was carried out using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The specific primers for the quantitative PCR (real time PCR) were edited using the Primer Express® Software v. 3.0 (Applied Biosystems). Furthermore, 4 housekeeping genes were tested: Ribosomal 18S, Actin, Elongation factor 1 alpha (*EF1 $\alpha$* ), and Ubiquitin to determine the best reference gene for normalizing the relative expression values of the studied genes through the use of the geNorm algorithm (Vandesompele et al., 2002) and the coefficient of variation. The primers used to amplify the specific genes of the products, their GenBank accession numbers, and their percent efficiency are shown in Table 1. For the detection of *V. parahaemolyticus*, two genes were used: the *tdh+* gene and the gene *GyrB*, which were normalized using the *C<sub>T</sub>* of reference gene Ribosomal 18S (GenBank accession number HM775290, forward primer: 5'-ggaagagcgcgtttatcagt-3'; reverse primer: 5'-ATTCCCCGTTACCCGTTATC-3').

The reactions were carried out with the following components:  $1\times$  Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Abgene, Epsom, UK) and  $70\text{ nM}$  of each specific primer, activated with Thermo-Start I polymerase at  $95^{\circ}\text{C}$  for  $15\text{ min}$  followed by cDNA target amplification ( $45$  denaturing cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for  $30\text{ s}$ , annealing and extension at  $60^{\circ}\text{C}$  for  $1\text{ min}$ ), and a programmed melting curve from  $95$  to  $70^{\circ}\text{C}$  decreasing  $0.5^{\circ}\text{C}$  every  $10\text{ s}$ .

The efficiency of the PCR ( $E$ ) was calculated for each pair of primers by determining the slope of a serial dilution analysis of cDNA from different random experimental samples (treatments with and without bacterial challenges), using the method described by Yuan et al., 2006. The efficiency was calculated from  $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ . The results are presented as a normalized relative expression for the reference gene (Ribosomal 18S) using the method described by Pfaffl (2001). The Ribosomal ARNm 18S expression, used as an endogenous marker (housekeeping gene), did not show any significant change throughout the experiment as previously shown in another abalone species, *H. tuberculata* (Travers et al., 2010).

#### 2.8. Immunological parameters

##### 2.8.1. Hemolymph collection

Hemolymph ( $0.2\text{--}1\text{ mL}$ ) was collected separately from the pedal sinus of each abalone (obtained from the stage described under point 2.4) using  $1\text{ mL}$  sterile syringes and  $26\text{G} \times 1/2$  in needles. At each sampling time, equal volumes of hemolymph from 3 animals were grouped and immediately placed in ice to avoid coagulation. The total number of circulating hemocytes/mL was immediately determined using a hemocytometer and adjusted to a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL with Modified Hank's Balance



**Table 1**

Primers sequences (sense and antisense) used for validation of differential gene expression for Real-Time PCR. The results for the housekeeping genes tested are showed, gene expression stability measure (M) with geNorm algorithm (Vandesompele et al., 2002) and variation coefficient (var coef.).

Biological process	Gen name (GenBank access no.)	Primers sequences (sense and antisense)	Efficiency (%)	Reference	
Cytoskeleton	Calponine 2 (GH736951)	5'-ACGGTGGTGTTCAAAAGTTCGGAGA-3' 5'-GCGTTTATTGTCTGGGTAGGGTCC-3'	95	Travers et al. (2010)	
	Collagen (HO189117)	5'-ATGGGGACGGAATTGTGATT-3' 5'-ATTGGCATCGACGTAGGAG-3'	97	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	Cellular communication	LPr1 (HO189077)	5'-CTTCCGGTTTGTGTATCGACTTG-3' 5'-GGTCCGCACTCGTGTTCAT-3'	99	Silva-Aciades et al. (2011b)
Development, differentiation	Vdg3 (HO188887)	5'-GTCGACCACTTCAAGCACCT-3' 5'-AGACGATCTGAAACCGTTGG-3'	97	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	Vm2 (HO188933)	5'-CGTCCGAGCTCTGTATATCG-3' 5'-CCCTACGTGACCCACCTT-3'	94	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	Immunity	Caspase 8 (EU244374)	5'-GAGGAAAGGAAATCCAAAAGCCGT-3' 5'-TGTCTGAGAAACCTTCCATCCACTG-3'	92	Wang et al. (2008)
General metabolism	MEP (AY485641)	5'-TTCCAAGGATCCAAAACCTG-3' 5'-TGAACGTCAITGCTCTTGA-3'	93	Mah et al. (2004)	
	Alginase (HO188888)	5'-GATGGACCAACTGCTCTGGT-3' 5'-CCCTTTTATGGAGTTCAG-3'	98	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	ATP synthase (HO189089)	5'-GGCGGACTATAATCTAACGGTTTC-3' 5'-AGCAGGTGCACCCAGCACTT-3'	96	Silva-Aciades et al. (2011b)	
Stress protein	Ferritin (HO188895)	5'-CATATTGATCTGGCGTTGA-3' 5'-TCGACGCTATCAAAAGCACT-3'	96	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	Hsp40 (EU244371)	5'-AAGTATGCGGAAGAAGGTTCTGAAGG-3' 5'-TTGTGGTCTGTCCGTCTGGTTGAG-3'	91	Wang et al. (2008a, 2008b)	
	Laminin (HO189063)	5'-GGCTGCTTGTCTTCTTTTCA-3' 5'-AATGGGATGTGATGGTGGATCT-3'	97	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	Senescent protein (HO188884)	5'-ACCTGTCTCACGACGGTCTAAAC-3' 5'-TTCATAGCGACGTGCTTTTG-3'	95	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	Cellular respiration	Cytox1 (HO188891)	5'-TTCTGTGATGGGCTCAGGTAAC-3' 5'-AGCCCCGACACCAAGCTA-3'	101	Silva-Aciades et al. (2011b)
	Cytox3 (HO188893)	5'-TAGGCTCAGAAAGGCAAAAGAA-3' 5'-GAGAGGGCACATCCAAAGGA-3'	97	Silva-Aciades et al. (2011b)	
Housekeeping genes	NADHsub4 (HO188894)	5'-ATGGCATTTATTGTCCACTTTAC-3' 5'-GATAGGAAGAGCCGACATCGAA-3'	100	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	Ribosomal 18S (HM775290)	5'-GGAAGAGCGCGTTTATCAGT-3' 5'-ATTTCCCGTTACCCGTTATC-3'	100	Aranceta-Garza et al. (2011)	
	Actin (HO188931)	5'-AGGTTCCGTTGCCAGAGT-3' 5'-CCAGCAGATTCATACCAAGA-3'	93	Silva-Aciades et al. (2011b)	
	EF1α (HO189056)	5'-GGAGAACAGGCTTGGCAGACT-3' 5'-AGACCGGCAAGATGACCAAA-3'	95	Silva-Aciades et al. (2011b)	
Housekeeping genes	Ubiquitin (HO188939)	5'-GGGCCAGACCATCACTCTT-3' 5'-GGCAAGATCAGCCTGTCT-3'	96	Silva-Aciades et al. (2011b)	
				M	Var coef.
				0.065	0.029
				0.069	0.085
				0.115	0.071
				0.104	0.066

Salt Solution (MHBSS) ((w/v) 2.08%  $C_6H_{12}O_6$ , 2.24% NaCl, 0.082% KCL, 0.02%  $KH_2PO_4$ , 0.071%  $CaCl_2$ , 0.262%  $MgCl_2$ , 0.314%  $MgSO_4$ , 0.003% EDTA) to ensure that the same number of blood cells were used in each test. For the morphological characterization of hemocytes by flow cytometry analysis, the hemolymph of 20 abalones (1 mL per animal) from the group of 15-month old individuals (7 months post-weaning) was used, and it was then fixed with RNA Later and stored at  $-80^\circ C$  until its use.

### 2.8.2. Total hemocyte counts

100  $\mu L$  of hemolymph were added to 200  $\mu L$  of Alsevers buffer (w/v 2.08%  $C_6H_{12}O_6$ , 0.8%  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ , 0.336% EDTA, 2.24% NaCl, 12% HCHO). The total number of circulating hemocytes was counted in triplicate with a hemocytometer under the microscope at a magnification of 100 $\times$ .

### 2.8.3. Phagocytosis assay against killed *V. parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* were cultured at  $25^\circ C$  for 24 h in Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid) supplemented with 2.0% (w/v) NaCl. The bacteria were extracted by adding 10% formalin and the mixture was centrifuged at 12,000g for 10 min to get the pellet. Then the bacteria were washed twice in potassium phosphate 0.1 M, pH

6.9 sterile buffer and resuspended in  $NaHCO_3$  0.1 M pH 9.0 and labeled with fluorescein 5-isothiocyanate, isomer 1 (FITC, Sigma) as described by Malham et al., 2003. Aliquots of bacterial suspension were stored at  $-20^\circ C$  until use.

A volume of 100  $\mu L$  of hemolymph at a concentration of  $1 \times 10^6$  hemocytes/mL in MHBSS was placed inside a ring (1.5  $cm^2$ ) of silicone on a glass slide according to a method described by Macey and Coyne (2005). The slides were placed in a moist, dark incubation chamber for 20 min to allow the hemocytes to adhere to the glass. 100  $\mu L$  of FITC-labeled *V. parahaemolyticus* was added to the cells. The slides were returned to the incubation chamber for 30 min. The slides were rinsed three times with MHBSS before adding 100  $\mu L$  of an ethidium bromide (Sigma) solution [50  $\mu g/mL$  in phosphate buffered saline – PBS (7.3 mM monosodium phosphate, 180 mM disodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2)]. The ethidium bromide solution was removed after 1 min by rinsing the slide with MHBSS. A glass coverslip was placed on top of the silicone ring. The phagocytic activity was expressed as the percentage of phagocytic hemocytes quantified from 400 adhered cells and observed under an Olympus fluorescence microscope with a 488 nm filter, in triplicate for each treatment and sampling time.



### 2.8.4. Analysis of hemolymph cell populations

Cell suspensions obtained and processed as described in Section 2.8.1 were analyzed for morphological and fluorescence parameters in a FACSCalibur™ flow cytometer (Becton Dickinson) operated with FACSFlow™ (BD). The cell samples fixed with RNA Later were washed prior to processing. After centrifugation (500g, 15 min) the cloudy phase at the bottom of the tube was washed in sterile distilled water and passed through an 80 µm filter to eliminate the flocculants. The pellets obtained from each individual were pooled and resuspended in HEPES buffer (10 mM, pH 7.5) supplemented with 0.15 M NaCl, 1 mM Mg<sup>2+</sup>, and 2.5 mM Ca<sup>2+</sup> then centrifuged at 300g for 10 min. A panel of 8 FITC-conjugated lectins selected for a variety of sugar specificities (Vector Laboratories) was prepared in the same buffer to yield a final concentration in the range of 1.25–25 µg/mL as recommended by the vector producer (Table S1). Each pool was divided in 8 aliquots and incubated with a lectin in 5 mL polypropylene microtubes (8 °C, 30 min in the dark). Cell suspensions were then washed by centrifugation (120g, 10 min) with HEPES buffer. The analysis by flow cytometry included the following parameters: Forward (FSC) and side (SSC) light scatter, green fluorescence intensity for absorption at 530 nm (FL1). The total number of events acquired was set to a minimum of 7500. The data were analyzed with the CellQuest™ software (BD).

### 2.9. Statistical analyses

All the results expressed as mean with standard deviation were subjected to variance analysis (ANOVA). Significant differences were set at  $P < 0.05$ . When the effects of ANOVA were significant, the determination of the factors that can contribute significant differences was made by means of the Tukey multiple comparison test using the MINITAB version 15 statistical software. The statistical analyses were performed using the values of Real-Time PCR assays, growth, survival, hemocyte count, and percentage of phagocytosis obtained from each triplicate biological sample collected at each time point. Normality and homoscedasticity of values were verified. The graphs and tables show the mean values  $\pm$  standard deviation. The non-parametric method of Kaplan–Meier (MEDCALCs version 9.6.4.0) test was used to estimate survival rates during infection with *V. parahaemolyticus* and the Log-Rank and Wilcoxon values for comparing differences between the groups.

## 3. Results

### 3.1. Determination of the effect of probiotics on the growth and survival of *H. rufescens* abalones

Table 2 shows the results of the bioassay made in the commercial hatchery. The values indicate that abalone fed with a probiotic diet improve significantly ( $P < 0.05$ ) their growth in terms of length (mm) and weight (g) and of their percentage of survival with respect to the control without probiotic diet at months 1 and 7 post-weaning.

### 3.2. Percent survival of recently weaned and juvenile *H. rufescens* fed with or without a probiotic-supplemented diet after *V. parahaemolyticus* (Vp) challenge

The effect of Vp on the survival of abalones at 1 and 7 months post-weaning for a post-infection period of 96 h is shown in Fig. 1. In recently weaned abalones (Fig. 1a), the peak of survival were reached at 96 h post-infection with values of 51.7% in animals fed a normal diet (macroalgae) and 63.3% for those fed a normal diet supplemented with probiotics. The Kaplan–Meier curves revealed statistical differences between both treatments ( $P < 0.01$ , Log-Rank and Wilcoxon tests). In comparison, for juvenile abalones (Fig. 1b) peak of survival were reached at 96 h post-infection with values of 51% and 72%, respectively, for animals fed the normal and probiotic diets ( $P < 0.01$ , Log-Rank and Wilcoxon tests).

### 3.3. Quantification and detection of Vp in abalones with bacterial challenged treatment

The results of the quantification of CFU of Vp per gram of abalone soft tissue on CHROMagar vibrio® Petri dishes and the detection of the Vp *tdh* and Vp *Gyr* genes by Real-Time post-challenge PCR in a period of 96 h are shown in Table S2. These results show an impact of the probiotics on the density of *V. parahaemolyticus* in abalone. In all the treatments, the normalized value ( $\Delta C_T$ ) of each target gene decreases as the concentration of Vp increases over time. In recently weaned abalones (1 month post-weaning) there was a statistically significant concentration of Vp in animals treated without probiotic supplement 48 h post-challenge ( $P < 0.05$ ). On the other hand, in abalones at 7 months post-weaning there is a higher concentration of the pathogenic bacteria ( $P < 0.05$ ) in the treatment without probiotic supplement 72 h post-infection.

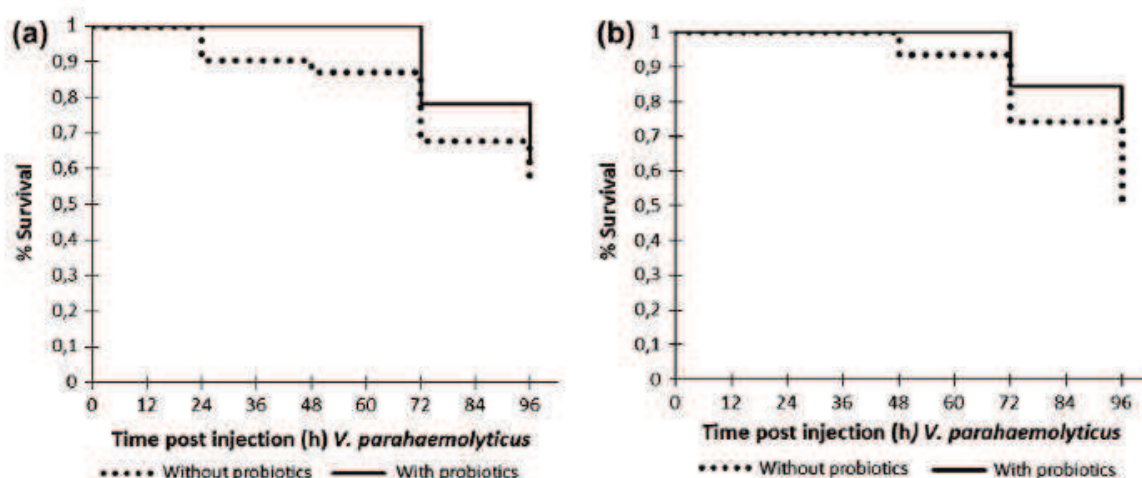
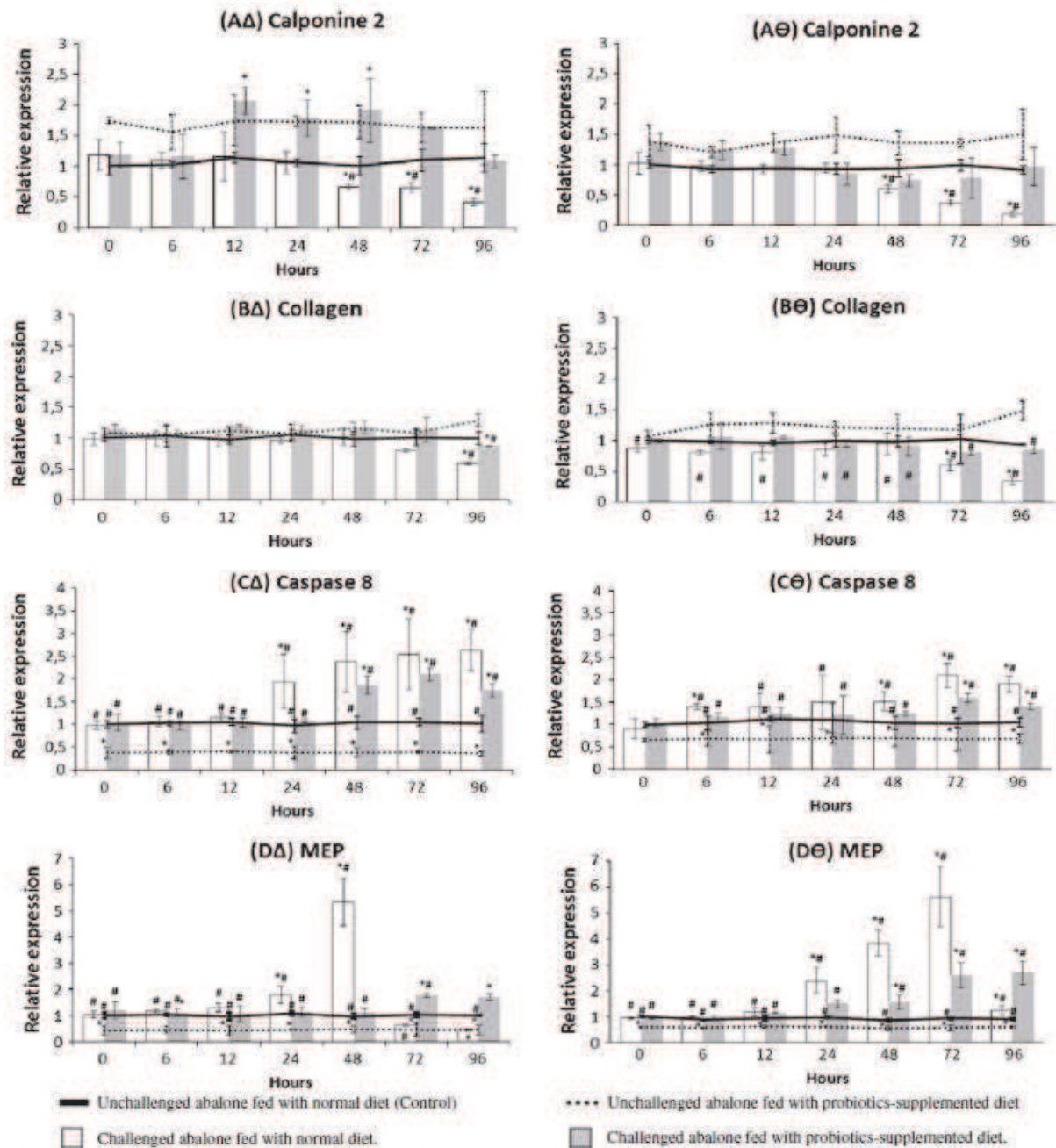


Fig. 1. Kaplan–Meier survival curves of recently weaned (a) and juvenile (b) *H. rufescens* fed with or without probiotics-supplemented diet during infections with *V. parahaemolyticus*.





**Fig. 2.** Analysis of differential expression of genes in recently weaned ( $\Delta$ ) and juvenile ( $\theta$ ) abalone *H. rufescens* following a bacterial challenge (*V. parahaemolyticus*). Bars and horizontal lines represent the mean of three replicates per sampling point and vertical lines show SD. (A and B) Cytoskeleton organization; (C and D) immune system process; (E–H) stress protein. \*Significant difference with unchallenged abalone fed with normal diet ( $P < 0.05$ ); #significant difference with unchallenged abalone fed with probiotics-supplemented diet ( $P < 0.05$ ).

The conventional PCR and further electrophoretic analysis revealed the presence or absence of each amplified PCR product (*tdh* and *Gyr* genes) from animals infected and uninfected with *V. parahaemolyticus*, respectively (data not shown).

#### 3.4. Gene expression profile from different functional categories after *Vp* challenge

Using Real-Time PCR we have analyzed the effect of an infection with *Vp* on the expression of 16 transcripts of mRNA in abalones of two ages (1 and 7 months post-weaning) fed with and without

probiotic supplement, compared to treatments without bacterial challenge (Fig. 2 and Supplementary Fig. S1). Additionally, the specific detection of amplified PCR products of all the selected genes and housekeeping genes were confirmed electrophoretically (data not shown).

Expression of the genes related to the cytoskeleton (Calponine 2, Collagen) for the two age groups did not show any significant variation over the whole experimental period between the treatments without bacterial challenge fed with and without probiotic diet ( $P > 0.05$ ; Fig. 2AΔ–Aθ; BΔ–Bθ; Fig. 2AΔ–Aθ; BΔ–Bθ). When comparing the treatments with bacterial challenge, the expression



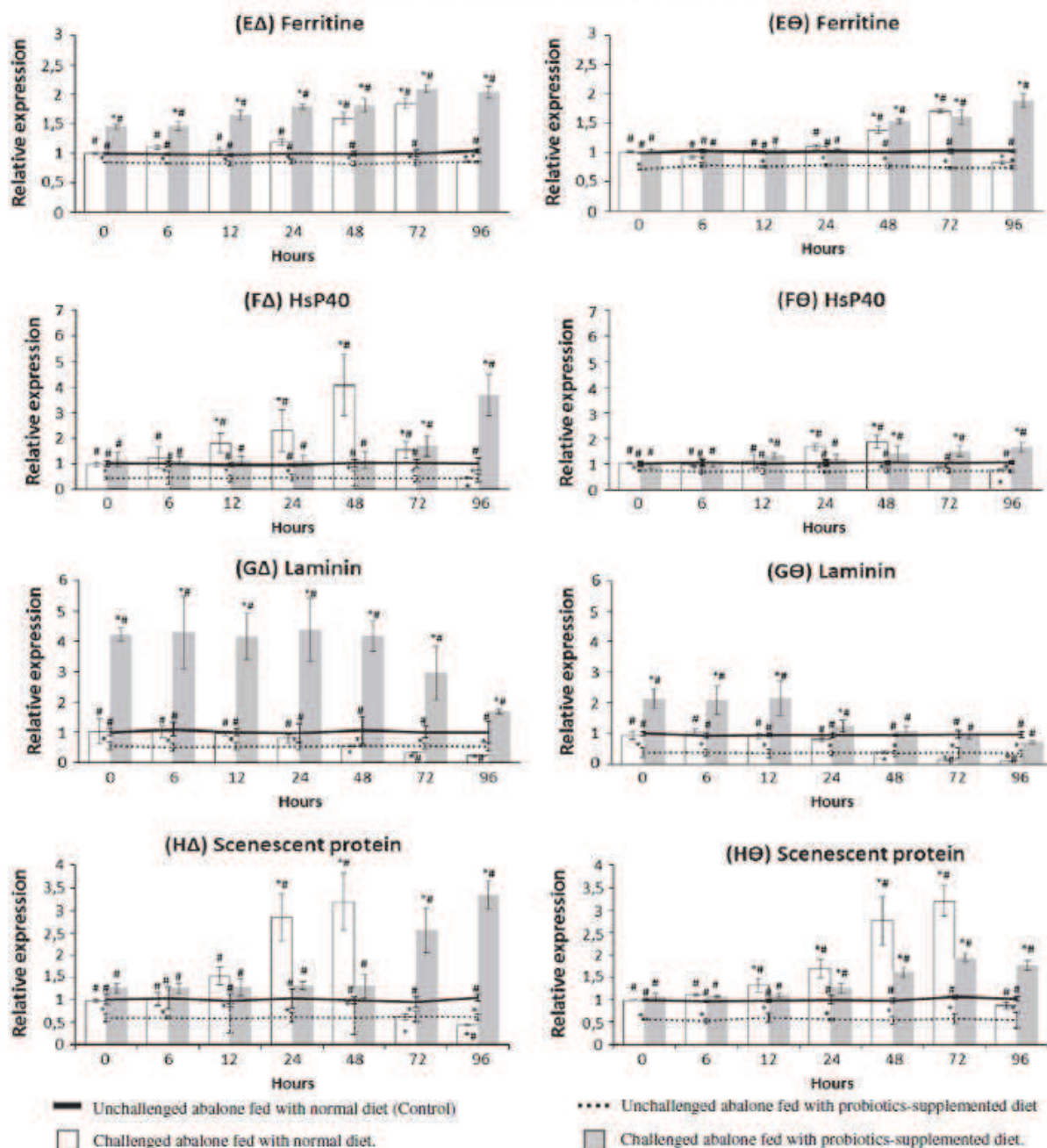


Fig. 2. (continued)

level of Calponine 2 was significantly lower in abalones at 1 and 7 months post-weaning fed without a probiotic diet after 48 h post-challenge ( $P < 0.05$ ; Fig. 2AΔ–AΘ), while in the animals fed with a probiotic diet, the gene was overexpressed after 12 h only in abalones aged 1 month post-weaning ( $P < 0.05$ ; Fig. 2AΔ). Among the treatments with bacterial challenge, the expression of the mRNA levels for the collagen gene was lower in animals without the probiotic diet after 72 h for the abalones of the two age groups ( $P < 0.05$ ; Fig. 2BΔ–BΘ) compared to those animals fed with a probiotic diet. However, there are no significant differences in the expression of the gene in the two age groups of animals fed with a probiotic diet, but a significant higher expression is observed compared to animals without the probiotic diet at 96 h.

Genes related to the immune system (Caspase 8 and *MEP*) were expressed differentially (Fig. 2CΔ–CΘ and DΔ–DΘ). The Caspase 8 gene was overexpressed after 24 h in the two sampled age groups for the treatment with bacterial challenge fed without probiotic diet. In the treatment challenged with *Vp* and fed the probiotic diet, Caspase 8 had a higher expression from 48 and 72 h for the animals aged 1 and 7 months post-weaning, respectively ( $P < 0.05$ ; Fig. 2CΔ–CΘ). In the treatments with bacterial challenge fed without a probiotic supplement, the *MEP* gene showed an overexpression from 24 to 48 h for animals aged 1 month post-weaning, and from 24 to 72 h for animals aged 7 months post-weaning, followed by a strong decrease in both age groups at 96 h. However, for the treatments fed with probiotic diets there is an increase of



gene expression after 72 h post-infection ( $P < 0.05$ ; Fig. 2DA–D ) for the two sampled age groups. In the treatments fed with probiotics, the expression of Caspase 8 and MEP is lower than observed in the treatment without probiotic food ( $P < 0.05$ ). Comparing the treatments with and without bacterial challenge fed with probiotics, there is a greater expression of the genes in individuals infected with the pathogen over the whole experimental period ( $P < 0.05$ ).

The expression of the four genes related to the synthesis of stress proteins (ferritin, Hsp40, laminin, and senescent protein) in the treatments fed without probiotic diet of the two sampled age groups showed a significant increase for times from 12 to 72 h in animals infected with the pathogenic bacteria, and then decreased toward 96 h ( $P < 0.05$ ; Fig. 2EA–E ; FA–F ; GA–G  and HA–H ). Gene expression between treatments with bacterial challenge was higher at 96 h in animals fed the probiotic diet ( $P < 0.05$ ). Moreover, infected animals fed probiotic diets in both age groups had higher gene expression for the 4 genes for stress proteins at all the sampled times ( $P < 0.05$ ).

The expression of the *Lpr1* gene related to cellular communication (Fig. S1AA–A ) among treatments without the probiotic supplement was significantly lower after 48 h in animals treated with bacterial challenge compared to unchallenged animals in the sampled age groups ( $P < 0.05$ ). In treatments with *Vp* infection, increased gene expression is seen in animals fed with probiotics ( $P < 0.05$ ) in both age groups. When comparing the treatments without bacterial challenge, the expression of the two genes was higher in animals fed with probiotic supplements ( $P < 0.05$ ). The expression of the *Lpr1* gene among the treatments fed with probiotics was higher from 24 to 72 h in animals infected with *Vp* for both age groups ( $P < 0.05$ ).

Expression of the genes related to general and energy metabolism (Alginase and ATP synthase) are shown in Fig. S1. The alginase gene showed a significant decrease after 24 and 72 h among the treatments without probiotic food in animals aged 1 and 7 months post-weaning, respectively, infected with the pathogenic bacteria (Fig. S1BA–B ;  $P < 0.05$ ). However, expression of ATP synthase for the same treatment was overexpressed after 24–72 h, then its expression dropped significantly at 96 h in both age groups (Fig. S1CA–C ;  $P < 0.05$ ). Among the unchallenged treatments, the expression of the three genes was significantly lower in animals fed with probiotics compared to those without probiotic food ( $P < 0.05$ ) at all sampling times. On the other hand, when comparing the treatments fed with probiotic diets for the two age groups, an increase is seen in the expression of the 3 genes over the whole experimental period in the abalones infected with *Vp* ( $P < 0.05$ ).

The three selected genes that encode proteins involved in cellular respiration, *Cytox1*, *Cytox3* and *NADH4* (Fig. S1DA–D ; EA–E ; FA–F ), were first overexpressed among treatments without probiotic food, then significantly inhibited near 96 h in animals infected with the pathogenic bacteria for both abalone age groups, compared to animals that were not subjected to bacterial challenge ( $P < 0.05$ ), with the exception of the *NADH4* gene in animals aged 7 months post-weaning, which showed no significant difference in expression between challenged and unchallenged animals ( $P > 0.05$ ). Among treatments of both age groups fed with probiotic diets, higher significant gene expression is seen near 96 h in abalones infected with *Vp* for all the selected genes involved in cellular respiration ( $P < 0.05$ ). The expression kinetics of the three cellular respiration genes among the treatments infected with *V. parahaemolyticus* show higher levels in a time range that varies from 12 to 96 h post-infection in animals fed with probiotics compared to animals fed without probiotics ( $P < 0.05$ ).

The only genes that did not show significant differences in any of the treatments ( $P > 0.05$ ) were related to the metabolic pathway of development and differentiation (*Vdg3* and *Vm2*).

### 3.5. Total circulating hemocyte counts

The *Vibrio* challenge induced a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in total hemocyte counts from 24 and 48 h in animals aged 1 and 7 months post-weaning, both with and without probiotic treatment. On the other hand, counts were significantly higher in animals with probiotic treatments compared to those fed diets without probiotics in both age groups ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3AA–A ).

### 3.6. Phagocytic activity of hemocytes

The proportion of phagocytic hemocytes remained higher in animals fed a probiotic diet compared to animals without a probiotic diet in both age groups (Fig. 3BA and B ). Furthermore, animals that were challenged with the pathogenic bacteria showed a significantly lower phagocytic capacity ( $P < 0.05$ ) compared to those not challenged. This effect was observed ( $P < 0.05$ ) at 24 h post-challenge in the group aged 1 month post-weaning, with or without probiotic treatment (Fig. 3BA). In the group aged 7 months post-weaning (Fig. 3B ), this effect was observed after 48 and 24 h post-challenge.

### 3.7. Analysis of hemolymph cells by flow cytometry

Two subpopulations were recognized in FSC (size) vs. SSC (complexity) scatterplots (Fig. 4). Cell size was the more discriminating structural parameter, with a subpopulation (pop1) of relatively small cells appearing close to the SSC axis and another (pop2) of larger cells located in the range from 50 to 420 on FSC axis. The elongated shape of this latter population on the scatterplot could have resulted from a larger variety of cell size, but also from cell aggregates that occur naturally in invertebrate hemolymph. Instrument settings used for this analysis indicate that all cells had a low complexity and that the complexity was comparable in both subpopulations as demonstrated by their position in the range of  $2 \times 10^0$ – $10^2$  channel on the SSC axis.

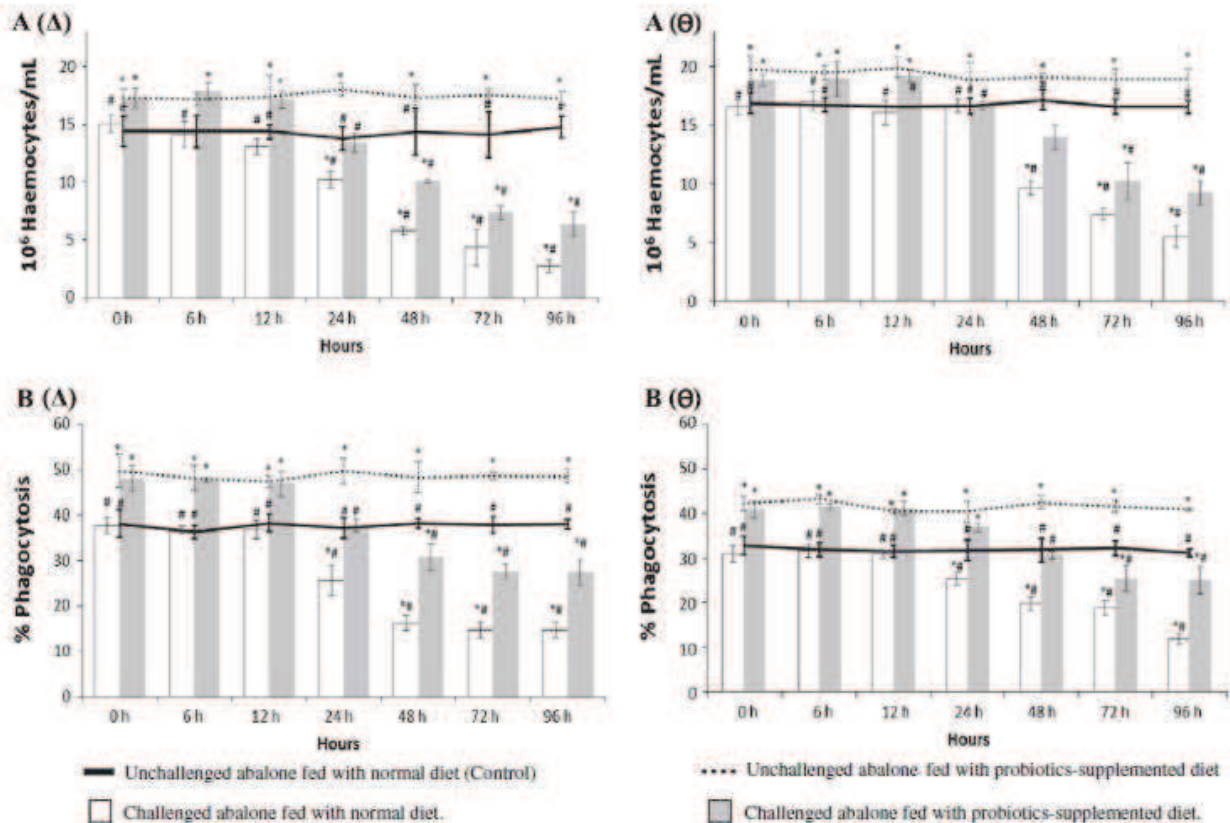
Subpopulation numbering was done by counting events appearing in the upper right quadrant corresponding to cells preferentially labeled by the lectin WGA (Fig. 5). The WGA population corresponded to the smaller cells in the FSC vs. SSC scatterplot (Fig. 4). Larger cells (pop2 in Fig. 4) were localized in the lower right quadrant (Fig. 5B) and were considered unlabeled. In control individuals, the WGA-positive label accounted for about 40% of total hemolymphatic cells. As described above, these cells corresponded to the subpopulation of small cells (Fig. 6). Considered individually, neither bacterial challenge or probiotic treatment altered the size partitioning seen in the WGA-labeling; however, associating these treatments altered the relative number of WGA-positive cells, which rose from 40% to 56% (Fig. 6).

## 4. Discussion

### 4.1. Benefits of probiotics on performance

Our study demonstrates the importance of abalone being fed with a diet of macroalgae supplemented with probiotic bacteria over a period of 7 months in order to improve both growth and survival of juvenile abalones cultured in a hatchery. As already mentioned, two of the three strains used in this study, *A. albus* strain F1-UMA and *Vibrio* sp. strain F15-UMA, were selected on the basis of their ability to degrade carbohydrates, proteins and lipids present in the abalone diet (Silva-Aci res et al., 2011a). Previous reports indicate that potential probiotic bacteria of the genus *Vibrio* isolated from the digestive system of the abalone ferment algal polysaccharides, producing up to 68 mM acetic and formic acids

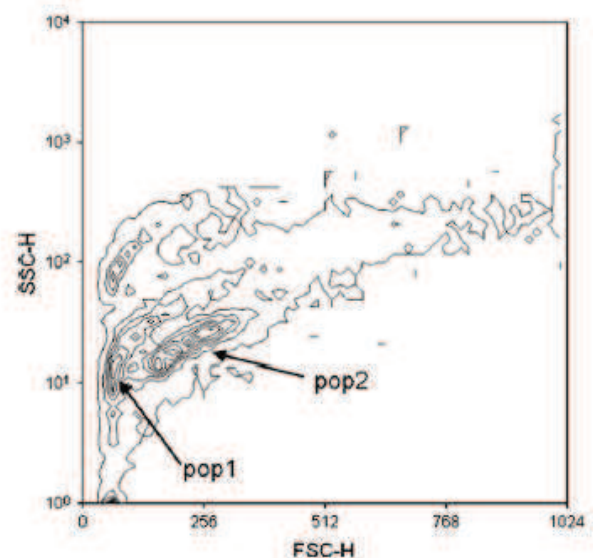




**Fig. 3.** Total circulating haemocytes ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) (A) and percentage phagocytic haemocytes (B) in recently weaned ( $\Delta$ ) and juvenile ( $\Theta$ ) abalone *H. rufescens* following a bacterial challenge (*V. parahaemolyticus*). Bars and horizontal lines represent the mean of three replicates per sampling point and vertical lines show SD. \*Significant difference with unchallenged abalone fed with normal diet ( $P < 0.05$ ); #significant difference with unchallenged abalone fed with probiotics-supplemented diet ( $P < 0.05$ ).

as the main fermentation products of alginate, suggesting that those probiotics in the intestine of abalone may be important for the conversion of alginate to acetic acid and contribute to the nutrition of the host organism (Sawabe et al., 2003). Conversely, *A. albus*, is a marine bacterium capable of degrading the cell wall of brown algae (Yi and Shin, 2006). Fu et al., 2008 point out that this strain forms deep depressions in agar plates, suggesting high agarolytic activity. Probiotics improve the intestinal balance of the organism that incorporates them into its intestinal microflora, benefiting its health and growth (Gulliam et al., 2004; Macey and Coyne, 2005; Senok et al., 2005). In the case of abalone, probiotic bacteria play an overall role in their nutrition because they have enzymes that hydrolyse macroalgae to simple polymers and smaller units that are rapidly assimilated by the abalone (Erasmus et al., 1997). The enteric bacteria in abalone produce enzymes capable of degrading agar, carrageenin, laminaria and alginate, suggesting that the bacterial enzymes are secreted in the lumen of the stomach where they can hydrolyze complex polysaccharides, improving the digestibility of micro- and macroalgae (Erasmus et al., 1997; Sawabe et al., 2003; Macey and Coyne, 2005; Daume, 2006). Later publications have documented the effect of probiotics on the growth of abalones not only in an experimental context but also in cultivation in hatcheries (Ten Doeschate and Coyne, 2008; Iehata et al., 2009, 2010; Silva-Aciaries et al., 2011a), extending the hypothesis that improvement in the performance of abalones in culture is, in part, due to digestive enzymes present in probiotic bacteria that are needed to digest ingested algae, leading to better absorption of nutrients by the abalones.

Our data about the presence of pathogen in experimentally infected abalones is in accordance with data reported in different



**Fig. 4.** Density plot obtained by flow cytometry analysis of hemolymph cells (acquisition:  $n = 7500$ ) from a pool of 7 months post-weaning individual samples fixed by RNA Later reagent. Structural criteria as size (FSC-H axis) and complexity (SSC-H axis) allowed to identify two cell subpopulations (pop1 and pop2). FSC: light forward scatter (linear scale), SSC: light side scatter (log scale).

commercially important marine invertebrates, which shows higher bacterial concentration in the tissues as post-infection time in-



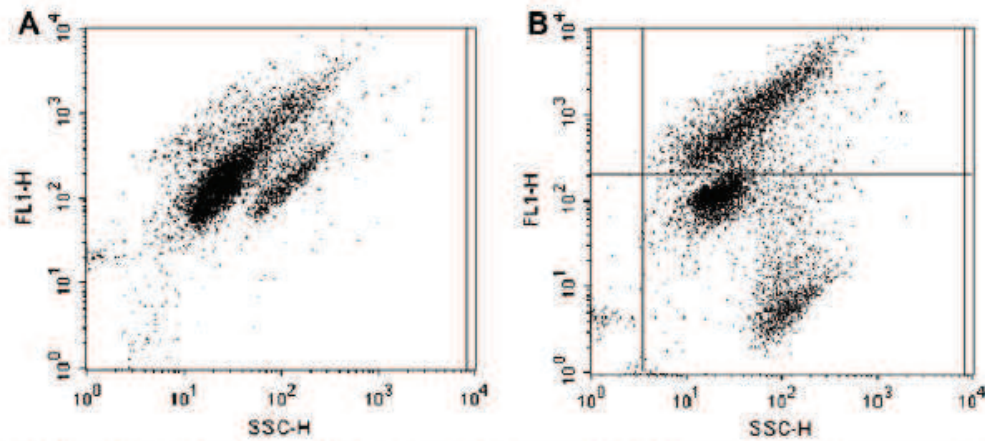


Fig. 5. Identification of hemolymphatic cell subpopulations in *H. rufescens* juveniles by fluorescent lectin labeling. Cell subpopulations appear as distinctive event groupings in scatterplots of green fluorescence intensity (FL1-H) vs. side scatter light transmission (SSC-H) obtained by flow cytometry. WGA (B) clearly discriminated two cell subpopulations whereas others, as SBA (A), did not. Events in the right upper quadrant (B) were considered as the most fluorescent cells. Background green fluorescence of unlabeled cells remained at low values between  $10^0$  and  $10^1$  (scatterplot not shown).

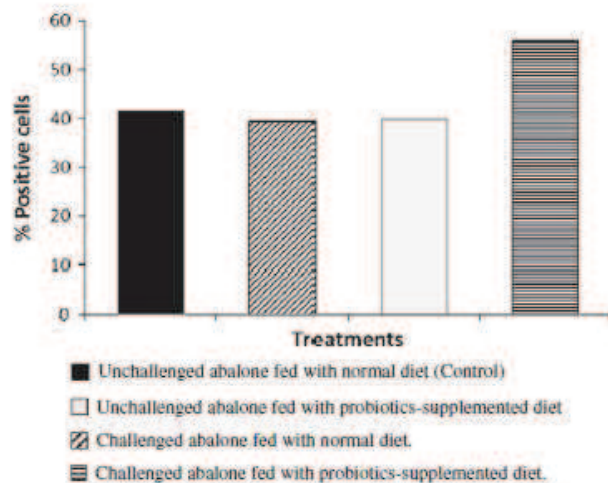


Fig. 6. Relative counts of WGA-positive cells in hemolymph of *H. rufescens* obtained by flow cytometry during a bacterial challenge (*V. parahaemolyticus*).

creases (Roque et al., 2009; Robert-Pillot et al., 2010). In this study, *Vibrio* sp. C21-UMA strain was chosen because of its ability to inhibit the growth of the pathogenic bacteria *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* (Silva-Aci res et al., 2011a). Based upon our results, probiotic bacteria gave the abalone the strong, general protection against pathogen challenge seen in other marine organisms in other studies (Balc zar et al., 2007; Swain et al., 2009; Lauzon et al., 2010; Liu et al., 2010). Bacterial antagonism is a common phenomenon in nature, and microbial interactions play a major role in the equilibrium between competing beneficial and potentially pathogenic microorganisms (Balc zar et al., 2006, 2007). In addition, microorganisms can be sources of a variety of bioactive natural products that have inhibitory effects on microbial growth and are of interest for both basic research and commercial development (Leyton et al., 2011).

#### 4.2. Effect of probiotic and pathogen on hemocytes population

Hemocytes play a crucial physiological role in non-specific cellular immunity against pathogens and parasites (Anderson, 1992; Panigrahi et al., 2005; Liu et al., 2010). Previous observations on

hemolymph cells, using microscopic or flow cytometric methods, revealed that members of the *Haliotis* genus mainly possess non-granular hemocytes (Travers et al., 2008b) and that another cell type called a blastocyte comprises a minor subpopulation of small, complex cells much involved in internal, antimicrobial defense (Travers et al., 2008a). In *H. rufescens*, we also identified one major cell type, pop2 (Fig. 4) that could be hyalinocytes, and a second, minor cell-type (pop 1) that could correspond to blastocytes. The fluorescent lectin WGA label that we used allowed efficient cell subpopulation analysis by flow cytometry, possibly due to its affinity for N-acetyl glucosamine residues in the outer membrane of hemocytes. Interestingly, Bettencourt et al., 2009 observed WGA labeling of mussel hemocytes in a granulocyte cell type. This suggests that the small, so-called blastocytes in *H. rufescens* would not be stem cells for hyalinocytes, but rather, may belong to another distinct cell line. In our experiment, we noticed that both probiotic treatment and bacterial challenge induced a severe alteration within circulating cell populations. Our results also show that the immune response of abalones to the bacterial challenge was less altered in individuals fed with probiotics, which could lead to increased survival to infection. This was confirmed by the presence of a higher concentration of *V. parahaemolyticus* in animals fed without probiotic diet in both age groups then subjected to bacterial challenge. The observed enrichment in small cells could reflect a drop in the number of other cell types, including hyalinocytes, suggesting the probiotic treatment favors the migration of immuno-competent cells from hemolymph into, most probably, tissues infected by *Vibrio* bodies as a result of the experimental challenge. We also noticed that the probiotic treatment limited the decrease of hemocyte counts and phagocytosis induced by the pathogenic challenge, as already reported in other invertebrates Macey and Coyne, 2005; Tseng et al., 2009; Aly et al., 2008; Liu et al., 2010; Mujeeb Rahman et al., 2010).

#### 4.3. Effect of probiotic and pathogenic bacteria on tissues structure

In abalones, pathogenic bacteria of the genus *Vibrio* produce infections in hemolymph but also in various tissues including the foot muscle (presumably via the hemolymphatic sinuses), where formation of multifocal aggregations of the bacteria has been reported (Travers et al., 2008a, 2009). The loss of muscle tone in animal infected by *Vibrios* and associated with a gradual decrease of motion has been reported, and in dying individuals of the abalone



*H. tuberculata*, decreased expression, mainly for the calponine 2 gene, indicates this gene may be inhibited as a result of infection by *Vibrio* (Travers et al., 2010). Handler et al., 2005 also reported the presence of multifocal bacterial aggregations in the foot muscle of abalone in response to vibriosis. In the present study, we followed the expression of three genes encoding proteins that are part of the cytoskeleton and related to muscular activity (calponine 2, collagen and laminin). Collagen is present in the foot and adductor muscles of abalones in a proportion of 1.2–4.1% of their wet weight, and play a pivotal role in the muscle structure (Yoneda et al., 2000). We showed that the expression of these genes was significantly lower in animals infected with the pathogenic bacteria and associated with the presence of lesions in the foot muscle produced by the *Vibrios*. Laminin is a glycoprotein expressed in all tissues, which is essential for the assembly of the basal membrane (Yurchenco and Wadsworth, 2004). It has been observed in the basal membrane of the foot of abalones (Harris et al., 2006). Though no direct evidence of the involvement of laminin in response to bacterial stress has been reported, our results suggest that the low expression observed of this transcript could decrease synthesis of the basal membrane and might be a result of bacterial infection, resulting in muscular weakening in the foot of infected animals.

So far, there are not studies of the effect of probiotics on the genes expression related to the cytoskeleton of marine invertebrates. However, our results indicate that the application of probiotics seems improve the performance of expression of transcripts in relation to animals without probiotic supplement and infected with pathogenic bacteria.

#### 4.4. Effect of probiotic and pathogenic bacteria on immunity

Bacterial infections generate many changes in the functioning of the immune system, and induce the host response by the activation of effectors in response to their stimulus. We analyzed the expression of three genes involved in the immune system (Caspase 8, *MEP* and *Lpr1*). Caspase 8 is known as an initiator of the caspase cascade involved in apoptosis as a process for maintaining cellular and tissue homeostasis (Hildeman et al., 2007). In the groups infected with the pathogenic bacteria and fed with probiotics, the expression of the caspase 8 gene increased over the entire experimental period, while the *MEP* gene expression increased significantly followed by a drastic decrease over time. In several studies with *H. diversicolor*, caspase 8 gene expression was shown to increase after a bacterial challenge causing the death, mainly of hemocytes (Wang et al., 2008a, 2008b; Huang et al., 2010). In our groups exposed to *Vibrio*, application of probiotics caused a decrease in caspase 8 expression at 96 h, compared to animals from groups not fed probiotics, suggesting a decrease in apoptotic processes. The *MEP* (macrophage expressed protein) gene, also known as perforin-like gene, has been reported (Mah et al., 2004) to play a role in pink and red abalones in the process of elimination and death of bacteria. It has been suggested that increase of *MEP* gene expression is dependent on the concentration of bacteria that have infected the tissue (Wang et al., 2008b). However, we observed the opposite effect with a drastic drop in *MEP* gene expression corresponding to increased concentration of bacteria in infected tissue, which could be partly explained by the inefficiency of the process of elimination of pathogenic bacteria in animals that are more susceptible and close to death. On the other hand, when comparing the trend of gene expression for these two genes between treatments without bacterial challenge, a lower expression is seen in animals fed with probiotic diet starting from the beginning of the experiment (time 0 h). This pattern was also seen in studies conducted in fish where the addition of probiotics to their diet was characterized by a decrease in the expression of immune related

genes which was interpreted as a decrease of energy use by the immune system with a related transfer of energy to the growth process (Tachi et al., 2011). *Lpr1* is a cellular signaling molecule and multifunctional scavenger that can affect the immune response by modifying the regulation of the proteolytic cascade signals (Gubb et al., 2010). The expression of the gene that transcribes receptor cellular signaling molecules (*Lpr1*) was inhibited in the groups infected with the pathogen but without probiotic food. In contrast, the *Lpr1* gene was shown to be up-regulated in the snail *Biomphalaria glabrata* when infected by the parasite *Schistosoma mansoni*, (Ittiprasert et al., 2010). Again, the lower expression of the *Lpr1* gene observed in our experiment could be due to the weak physiological status of animals and subsequent mortality in infected abalones (Fig. 1).

#### 4.5. Effect of probiotic and pathogenic bacteria on the stress response

In response to bacterial challenge in the groups not treated with probiotics, the expression of genes related to the synthesis of various stress proteins remained constant or slightly increased in the beginning then decreased by the end of the experimental period (96 h). During an infection, host cells regulate the availability of iron (Doherty, 2007), the presence of which is essential for the proliferation of *Vibrios* (Wyckoff et al., 2007; Ratledge, 2007). Ferritin is a key detoxification and iron storage protein in most living organisms, playing fundamental roles in homeostasis and cellular defense in invertebrates (Recalcati et al., 2008), and in reactive oxygen species (ROS) scavenging (Salinas-Claret et al., 2011). However, in our study, after an increase in ferritin expression, we observed a decrease towards the end of the experimental period, leading to a putative limitation in iron binding and a subsequent increase in *Vibrio* susceptibility. These results were previously reported in *H. tuberculata* by Travers et al., 2010, who showed, that under bacterial stress, the expression of ferritin decreases in dying organisms. Hsp40 belongs to the family of molecular chaperones that have an essential role in the maintenance of protein homeostasis during exposure to proteotoxic stressors (Wang et al., 2008a), and have been shown to be related to a network of interactions between the cytoskeleton, membrane proteins, transcriptional machinery, replication machinery and DNA repair, translational machinery, proteasomes, and proteolytic enzymes involved in cell physiology (Botha et al., 2007). A case of up-regulation in response to a bacterial challenge in *H. diversicolor* has been reported (Wang et al., 2008a) and in the venerid, *Venerupis philippinarum*, (Li et al., 2011) associated with a later decrease in gene expression. This tendency was also observed in our study, suggesting that during the bacterial infection process, HSP40s could play an important role in the physiological response toward stress. Another important gene coding for the senescent protein showed a decline in its expression after 96 h of exposure to *Vibrios* that could also be explained by an inability to express genes in animals in the final stage of vibriosis. The senescent protein has multiple functions including regulation of catabolic processes, decline and progression of apoptosis, and a role in detoxification of ROS (Weaver et al., 1998; Sperotto et al., 2008). The expression pattern of all these stress-related genes in the groups fed a probiotic diet and infected with the pathogen seems to increase at 96 h when compared with the groups fed without probiotics. This result indicates that the animals are synthesizing stress response proteins more efficiently toward the end of the experimental time period. As Travers et al. (2010) reported, we were more likely to be sampling animals more naturally resistant to vibriosis, and, as suggested by Travers et al. (2010), an overexpression of these genes may correspond to an increased efficiency in production in resistant animals compared to dying animals. Conversely, when the expression of the stress response genes was compared between



groups treated without bacterial-challenge, the results showed an inhibition of gene expression in groups treated with probiotic food, suggesting that in individuals in good immunologic condition, it is not necessary to overexpress these genes because they are not stressed. The energy saved can be redirected to growth processes (Tachi et al., 2011). This was seen in our results of the effect of probiotics on the growth and survival of treated abalones.

#### 4.6. Effect of probiotic and pathogen on metabolism

Studies conducted in other species showed a decrease in the expression of genes related to cellular and energy metabolism in animals susceptible to an infection or on the contrary, an increase in expression in resistant animals, suggesting a strong link between energy expended and resistance to vibriosis (Wang et al., 2008a; Travers et al., 2010). In our study, the expression of genes related to cellular and energy metabolism (alginase, ATP synthase and NADH) was shown to agree with other published results. Both alginase and ATP synthase expression decreased in animals infected with the pathogenic bacteria, mainly after 96 h post-bacterial challenge, in treatments without probiotics application, and an increase in animals fed with probiotics. The decrease in ATP synthase expression 96 h post-infection indicates a reduction in stored energy for maintenance and growth. Alginase is a polymannuronate lyase (poly-M) that degrades alginates (probably can eliminate this info: through a  $\beta$ -elimination mechanism, forming 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enopyranosyluronate at the new non-reducing terminus) (Shimizu et al., 2003). The low expression in response to *Vibrio* of the gene that encodes for alginase indicates a decrease in digestive metabolism and, consequently, a drop in the nutritional status of susceptible animals due to a decrease in the precursors for the synthesis of proteins, lipids, and sugars (Ten Doeschate and Coyne, 2008). Regarding the treatments without bacterial challenge, our results showed a decrease in the gene expression of both ATP synthase and alginase in animals fed a diet supplemented with probiotics from the start of the experiment, in comparison to control animals fed a non-probiotic diet. These results are similar to those found by Tachi et al. (2011), who showed that the application of diets supplemented with probiotics was associated with a decrease in expression of genes related to energy metabolism. In our study, a drop in energy consumption was probably due to the action of the probiotics, which provide additional digestive enzymes for ingested algae, improving the abalone growth and immunologic status as confirmed by our results (Figs. 1 and 3; Table 2).

**Table 2**

Growth of juvenile abalone fed with Normal diet (macroalgae) and probiotics diet (macroalgae supplemented with probiotic) to 1 and 7 months post-weaning, respectively.

	Normal diet	Probiotics diet	% Improvement
<b>Initial size</b>			
Length (mm)	16.00 $\pm$ 0.50	16.00 $\pm$ 0.50	
Weight (g)	0.71 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.03	
Survival (%)	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	
<b>Month 1</b>			
Length (mm)	20.04 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	22.26 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>	10.08
Weight (g)	1.30 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.82 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	28.57
Survival (%)	86.66 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup>	97.92 $\pm$ 2.18 <sup>b</sup>	11.50
<b>Month 7</b>			
Length (mm)	40.81 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	45.59 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	10.48
Weight (g)	12.26 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	15.50 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	20.90
Survival (%)	75.74 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	92.34 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>	17.98

Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation.

Different letters indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) between values in the same row.

Because of the importance of cellular respiration to energy production and consumption, the expression of three genes encoding proteins involved in that process (Cytoc1, Cytoc3 and NADH4) were investigated. NADH dehydrogenase is the first damaged component in the respiratory chain and may act as a free radical captor to maintain cellular homeostasis (Zapata et al., 2009). On the other hand, the cytochrome oxidases are hemoproteins that are joined to a membrane and are key enzymes of the aerobic metabolism in eukaryotes and many bacteria, and their activities may be significant for protection against oxidative stress (Bao and Lin, 2010; Diaz, 2010). The expression of all three cellular respiration genes increased initially then dropped significantly toward the end of the experimental time period in animals without a probiotic diet and later infected with the pathogenic bacteria. This result agrees with expression levels reported for the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus*, (Gestal et al., 2007) and the small abalone, *H. diversicolor*, (Wang et al., 2008a) after bacterial challenge, for the cytochrome and NADH genes, respectively. Down-regulation observed at the end of the experiment indicated a perturbation of mitochondrial activity that could generate oxidative stress especially in animals that are more susceptible to or dying from vibriosis. As seen in genes from other metabolic pathways in this study, animals infected with the pathogenic bacteria and fed with probiotics showed an increase in gene expression compared to animals fed without probiotics. This could reflect greater gene expression efficiency in animals that were more resistant to the bacterial infection. Furthermore, comparing gene expression related to cellular respiration between treatments without bacterial challenge showed a decrease at all sampling times for the treatments with probiotic food. This indicates that abalones with improved growth and immunologic condition due to a probiotic diet do not need to up-regulated the expression of cellular respiration genes. This could be related to the fact that these animals are less stressed so they can reduce their consumption of energy.

## 5. Conclusion

This transcriptomic and cellular analysis has shown significant effects on different physiologic processes of abalones under hatchery condition and demonstrated the benefits resulting from the addition of probiotics to the food in terms of growth and also resistance to *Vibrio* challenges. Future research on transcriptomics and proteomics at different developmental stages of this mollusk is needed to improve our knowledge and better understand the adaptive mechanisms developed by these organisms to respond to multiple environmental stressors, including pathogenic bacteria. This is particularly important for the cultivation of red abalones in Chile, which is mostly done onshore but where the potential maritime culture zones for this species have shown high concentrations of the *V. parahaemolyticus* pathogen.

## Acknowledgments

This study was financed by FONDEF-CONICYT Chile (Project D05110291). The authors are grateful to the aquaculture company Cultivos LiveSeafood S.A, Chile, who allowed the use of their facilities to carry out the experiments. The authors are grateful to Brenda J. Landau for an English proofreading of this article.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.03.004>.



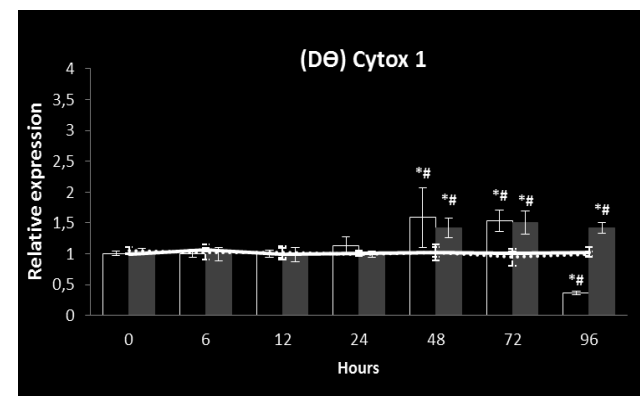
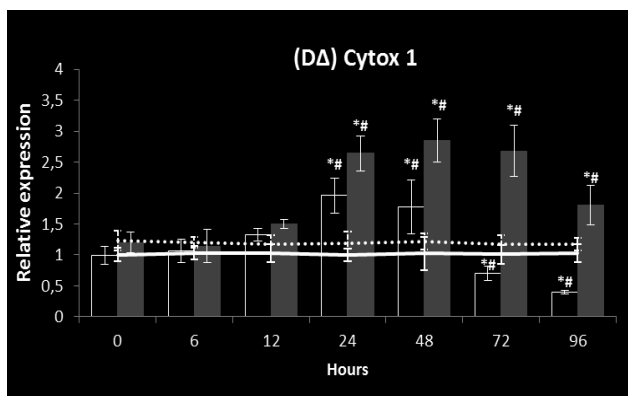
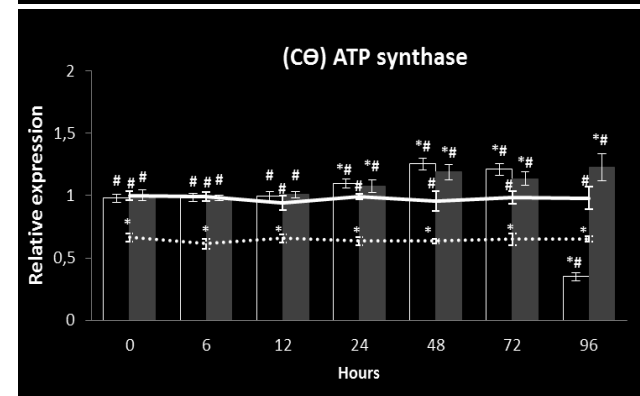
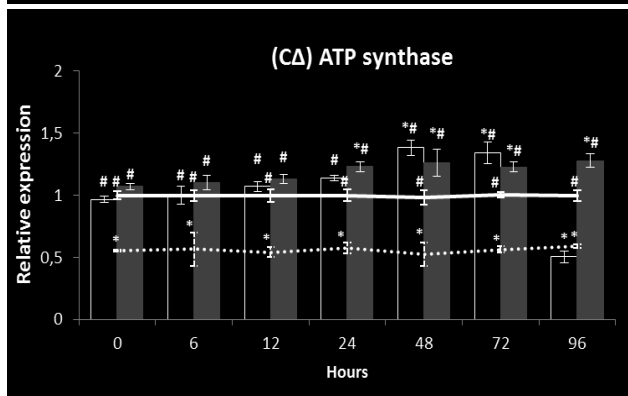
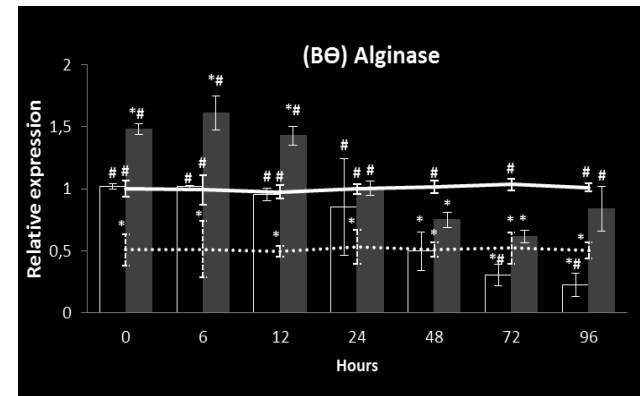
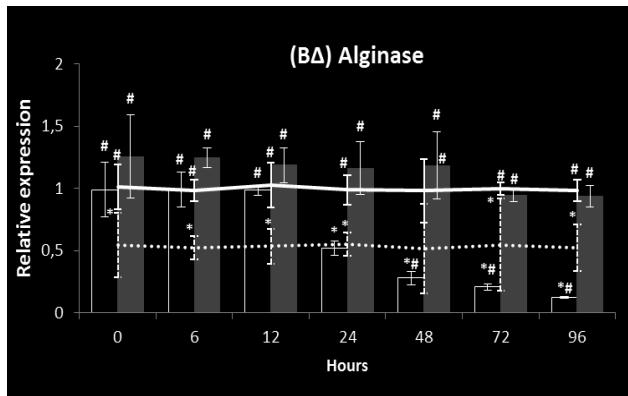
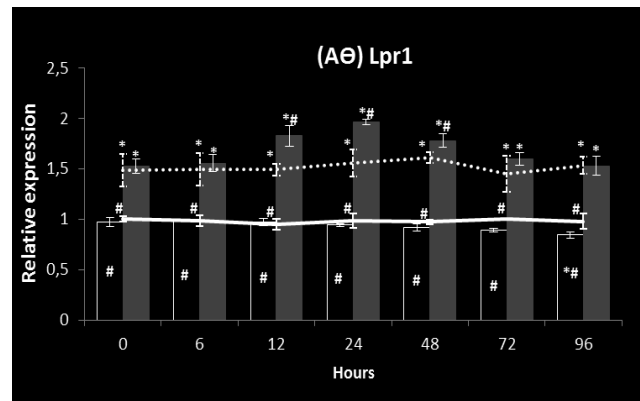
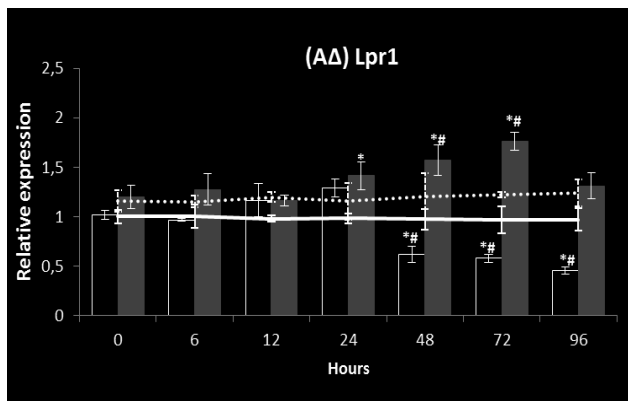
## References

- Aberomund, A., 2010. Occurrence and characterization of potentially pathogenic *Vibrio* species in seafood products and mariculture systems. *World J. Fish Mar. Sci.* 2 (5), 376–382.
- Aly, S.M., Mohamed, M.F., John, G., 2008. Effects of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquacult. Res.* 39, 647–656.
- Anderson, D., 1992. Immunostimulant, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 281–307.
- Aranceta-Garza, F., Perez-Enriquez, R., Cruz, P., 2011. PCR-SSCP method for genetic differentiation of canned abalone and commercial gastropods in the Mexican retail market. *Food Control* 22, 1015–1020.
- Balc zar, J., Vendrell, D., De Blas, I., Cunningham, D., Vandrell, D., Muzquiz, J., 2006. The role of probiotic in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173–186.
- Balc zar, F., Rojas-Luna, T., Cunningham, D.P., 2007. Effect of the addition of four potential probiotics strains on the survival of pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 147–150.
- Bao, Y., Lin, Z., 2010. Generation, annotation, and analysis of ESTs from hemocyte of the bloody clam, *Tegillarca granosa*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 740–746.
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalves molluscs. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 34–43.
- Bettencourt, R., Dando, P., Collins, P., Costa, V., Allam, B., Serr o-Santos, R., 2009. Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Comput. Biomed. Phys.* 152, 278–289.
- Botha, M., Pesce, E.R., Blatch, G.L., 2007. The Hsp40 proteins of *Plasmodium falciparum* and other apicomplexa: regulating chaperone power in the parasite and the host. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1781–1803.
- Cai, J., Li, J., Thompson, K., Li, Ch., Han, H., 2007. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *J. Basic Microbiol.* 47 (1), 84–86.
- Cheng, W., Hsiao, I.-S., Chen, J.-C., 2004. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 193–202.
- Daume, S., 2006. The role of bacteria and micro and macroalgae in abalone aquaculture: a review. *J. Shellfish Res.* 25 (1), 151–157.
- De Zoysa, M., Nikapitilla, Ch., Oh, Ch., Lee, Y., Whang, I., Lee, J., Choi, Ch., Lee, J., 2011. Microarray analysis of gene expression in disk abalone *Haliotis discus discus* after bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 611–673.
- Diaz, F., 2010. Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models. *A Review. Biochim. Biophys. Acta* 1802, 100–110.
- Doherty, C.P., 2007. Host-pathogen interactions: the role of iron. *J. Nutr.* 137, 1341–1344.
- Elston, R., Lockwood, G., 1983. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *J. Fish Dis.* 6 (2), 111–128.
- Erasmus, J., Cook, P., Coyne, V., 1997. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture* 155, 377–386.
- Flores-Aguilar, R., Gutierrez, A., Elwanger, A., Searcy-Bernal, R., 2007. Development and currents status of abalone aquaculture in Chile. *J. Shellfish Res.* 26, 705–711.
- Fu, X., Lin, H., Kim, S., 2008. Purification and characterization of a novel b-agarase, Aga34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 265–273.
- Fuenzalida, L., Armijo, L., Zabala, B., Hern andez, C., Riosco, M., Riquelme, C., Espejo, R., 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 117 (3), 270–275.
- Gestal, C., Costa, M., Figueras, A., Novoa, B., 2007. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: identification of new antimicrobial peptides. *Gene* 406, 134–143.
- Gubh, D., Sanz-Parra, A., Barcena, L., Troxler, L., Fullaondo, A., 2010. Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Rev. Biochim.* 92, 1749–1759.
- Gulliam, M., Thompson, F., Rodriguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233, 1–14.
- Hahn, K.O., 1989. Nutrition and growth of abalone. In: Hahn, K.O. (Ed.), *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 135–156.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-K rber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 12 (4), 714–719.
- Han, F., Wang, X., Yao, Y., Wang, Z., 2010. Molecular characterization of Ran gene up-regulated in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 327–333.
- Handler, J., Carson, J., Donachie, L., Gabor, L., Taylor, D., 2005. Bacterial infection in Tasmania farmed abalone causes pathology farm factors and control options. In: Walker, P. et al. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture V*.
- Harris, L., Lambkin, H., O'Byrne-Ring, N., 2006. Characterisation of cell types in abalone (*Haliotis* spp.) tissues using immunohistochemical techniques. *Aquaculture* 261, 1413–1421.
- Harth, E., Matsuda, L., Hern andez, C., Riosco, M., Romero, J., Gonz lez-Escalona, N., Mart nez-Urtaza, J., Espejo, R., 2009. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, Southern Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (2), 163–168.
- Hildeman, D., Jorgensen, T., Kappler, J., Marrack, P., 2007. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 516–521.
- Hisano, T., Nishimura, M., Yamashita, T., Imanaka, T., Muramatsu, T., Kimura, A., Murata, K., 1994. A simple method for determination of substrate specificity of alginate lyases. *J. Ferment. Bioeng.* 78, 182–184.
- Huang, C., Liu, Y., Lee, K., 2001. Withering syndrome of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and associated with thermal induction. *Z. Naturforsch.* 56 (9–10), 898–901.
- Huang, W., Ren, H., Gopalakrishnan, S., Xu, D., Qiao, K., Wang, K., 2010. First molecular cloning of a molluscan caspase from variously colored abalone (*Haliotis diversicolor*) and gene expression analysis with bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 587–595.
- Iehata, S., Inagaki, T., Okunishi, S., Nakano, M., Tanaka, R., Maeda, H., 2009. Colonization and probiotics effects of lactic acid bacteria in the gut of the abalone *Haliotis gigantea*. *Fisheries Sci.* 75, 1285–1293.
- Iehata, S., Inagaki, T., Okunishi, S., Nakano, M., Tanaka, R., Maeda, H., 2010. Improved gut environment of abalone *Haliotis gigantea* through *Pediococcus* sp. Abt treatments. *Aquaculture* 305, 59–65.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *Review. J. Fish Dis.* 25, 633–642.
- Ittiprasert, W., Millera, A., Myers, J., Nenec, V., El-Sayed, N., Knight, M., 2010. Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasit.* 169, 27–39.
- Lauzon, H., Gudmundsdottir, S., Stein rsson, A., Oddgeirsson, M., Martinsdottir, E., Gudmundsdottir, B., 2010. Impact of probiotic intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. *Aquaculture* 310, 139–144.
- Leighton, D., 2000. The influence of temperature on larval and juvenile growth in three species of southern California abalones. *Fish. Bull.* 72, 1137–1145.
- Leyton, Y., Riquelme, C., 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43 (3), 441–456.
- Leyton, Y., Riquelme, C., 2010. Marine *Bacillus* spp. associated with the egg capsule of *Concholepas concholepas* (common name “loco”) have an inhibitory activity toward the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Ecol.* 60, 599–605.
- Leyton, Y., Borquez, J., Darias, J., Cueto, M., D  az-Marrero, A., Riquelme, C., 2011. Oleic acid produced by a marine *Vibrio* spp. acts as an anti-*Vibrio parahaemolyticus* agent. *Mar. Drugs* 9, 2155–2163.
- Li, Ch., Li, L., Liu, F., Ning, X., Chen, A., Zhang, L., Wu, H., Zhao, J., 2011. Alteration of *Venerupis philippinarum* Hsp40 gene expression in response to pathogen challenge and heavy metal exposure. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 447–450.
- Liu, P.C., Chen, Y., Huang, C., Lee, K., 2000. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Lett. Appl. Microbiol.* 31 (6), 433–437.
- Liu, K., Chiu, Ch., Shiu, Y., Cheng, W., Liu, Ch., 2010. Effects of the probiotics, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 837–844.
- Lopez-Joven, C., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Furones, M., Roque, A., 2011. Experimental uptake and retention of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in two species of clams: *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Appl. Microbiol.* 111, 197–208.
- Macey, B., Coyne, V., 2005. Improved growth rate disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 245, 249–261.
- Macey, B., Coyne, V., 2006. Colonization of the gastrointestinal tract of the farmed South African Abalone *Haliotis midae* by the probiotics *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Mar. Biotechnol.* 8, 246–259.
- Mah, S., Moy, G., Swanson, W., Vacquier, V., 2004. A perforin-like protein from a marine mollusk. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2), 468–475.
- Malham, S., Lactose, A., G  l  bart, F., Cuff, A., Poulet, S.A., 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusk *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Biol.* 295A, 136–144.
- Merrifield, D., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Baker, R., Bogwald, J., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302 (1–2), 1–18.
- Moore, J., Robbins, T., Friedman, C., 2000. Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: thermal induction and association with gastrointestinal rickettsiales-like prokaryotes. *J. Aquat. Anim. Health* 12, 26–34.
- Mujeeb Rahiman, K., Jesmi, Y., Thomas, A., Hatha, M., 2010. Probiotic effect of *Bacillus* NE110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquacult. Res.* 41, 20–34.
- Paffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29, 2003–2007.
- Panigrahi, A., Viswanath, K., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 243, 241–254.
- Pruzzo, C., Gallo, G., Canesi, L., 2005. Persistence of *Vibrios* in marine bivalves: the role of interactions with hemolymph components. *Environ. Microbiol.* 7, 761–772.
- Ratledge, C., 2007. Iron metabolism and infection. *Food Nutr. Bull.* 28, 515–523.



- 150



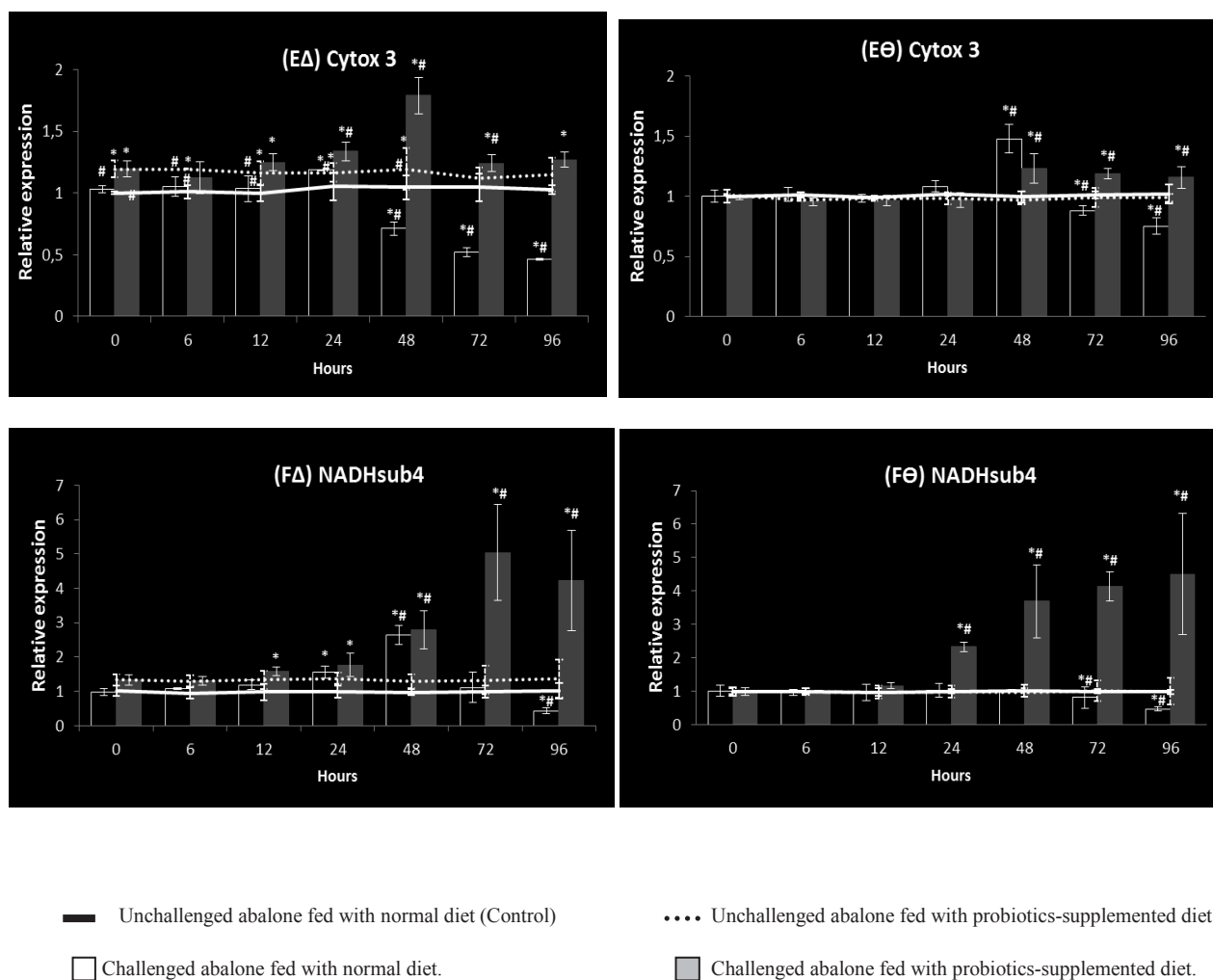


— Unchallenged abalone fed with normal diet (Control)

□ Challenged abalone fed with normal diet.

.... Unchallenged abalone fed with probiotics-supplemented diet

■ Challenged abalone fed with probiotics-supplemented diet.



**Fig .S1.** Analysis of differential expression of genes in recently weaned (Δ) and juvenile (Θ) abalone *H. rufescens* following a bacterial challenged (*V. parahaemolyticus*). Bars represent the mean of three replicates per sampling point and vertical lines show SD. (A ) Cellular communication; (B and C) General and energetic metabolisms; (D, E and F) Respiratory chain (respiration). \* Significant difference with unchallenged abalone fed with normal diet ( $P < 0.05$ ); # Significant difference with unchallenged abalone fed with probiotics-supplemented diet ( $P < 0.05$ ).

**Table S1.**

Known binding receptor (source: Vector Laboratories) and working concentration for plant lectins used in this study to characterize hemocyte subpopulations.

<b>Label</b>	<b>Lectins</b>	<b>Binding receptor(s)</b>	<b>Final concentration µg/mL</b>
<b>Con A</b>	Concanavalin A	mannose glucose	1.25
<b>WGA</b>	Wheat germ agglutinin	N-acetyl glucosamine	1.25
<b>PNA</b>	Peanut agglutinin	galactosyl N-acetyl galactosamine galactose	5
<b>SBA</b>	Soybean agglutinin	N-acetyl galactosamine	5
<b>DBA</b>	Lolichos biflorus agglutinin	N-acetyl galactosamine	2.5
<b>RCA</b>	Ricinus communis agglutinin	galactose N-acetyl galactosamine	5
<b>UEA</b>	Ulex europaeus agglutinin	fucose	2.5
<b>LCA</b>	Lens culinaris agglutinin	mannose	25

Table S2

Bacterial concentration ( $\times 10^4$  CFU/g soft tissue) and Real-Time PCR detection of *V. parahaemolyticus* (*Vp*) in (a) recently weaned and (b) juvenile abalone *H. mifescens* during infections with the pathogenic bacteria (0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h *Vp* post injection).  $\Delta C_T$  correspond to normalized value of the two target sequences (*tdh* and *GyrB*) in relation a reference gene (Ribosomal 18S). A: Abalone fed with normal diet; B: Abalone fed with probiotics supplemented diet.

Hours	(a) Weaned abalone						(b) Juvenile abalone					
	(A)			(B)			(A)			(B)		
	Conc. <i>Vp</i> ( $1 \times 10^4$ CFU/g)	$\Delta C_T$ <i>tdh</i>	$\Delta C_T$ <i>gyp</i>	Conc. <i>Vp</i> ( $1 \times 10^4$ CFU/g)	$\Delta C_T$ <i>tdh</i>	$\Delta C_T$ <i>gyp</i>	Conc. <i>Vp</i> ( $1 \times 10^4$ CFU/g)	$\Delta C_T$ <i>tdh</i>	$\Delta C_T$ <i>gyp</i>	Conc. <i>Vp</i> ( $1 \times 10^4$ CFU/g)	$\Delta C_T$ <i>tdh</i>	$\Delta C_T$ <i>gyp</i>
0	0.00±0.00	N.D	N.D	0.00±0.00	N.D	N.D	0.00±0.00	N.D	N.D	0.00±0.00	N.D	N.D
6	5.25±0.08*	21.96±0.30 <sup>†</sup>	21.96±0.63 <sup>‡</sup>	5.26±0.25*	21.94±0.20 <sup>†</sup>	N.D	5.23±0.12 <sup>§</sup>	21.81±0.53 <sup>§</sup>	21.90±0.42 <sup>§</sup>	5.29±0.12 <sup>§</sup>	22.46±0.18 <sup>§</sup>	21.79±0.10 <sup>§</sup>
12	5.77±0.15*	21.88±0.18 <sup>†</sup>	21.33±0.81 <sup>‡</sup>	5.49±0.35*	21.78±0.66 <sup>†</sup>	21.67±0.17 <sup>‡</sup>	5.57±0.42 <sup>§</sup>	21.98±0.12 <sup>§</sup>	21.98±0.23 <sup>§</sup>	5.31±0.10 <sup>§</sup>	23.27±0.32 <sup>§</sup>	22.79±0.28 <sup>§</sup>
24	8.85±0.22*	19.00±0.54 <sup>†</sup>	19.59±0.33 <sup>‡</sup>	8.55±0.21*	19.99±0.29 <sup>†</sup>	20.06±0.35 <sup>‡</sup>	8.06±0.38 <sup>§</sup>	19.82±0.57 <sup>§</sup>	19.92±0.19 <sup>§</sup>	7.06±0.40 <sup>§</sup>	20.24±0.54 <sup>§</sup>	20.95±0.45 <sup>§</sup>
48	15.44±0.78*	14.42±0.77 <sup>†</sup>	14.53±0.28 <sup>‡</sup>	13.32±2.49**	16.85±0.18 <sup>††</sup>	17.41±0.47 <sup>‡‡</sup>	12.88±1.81 <sup>§</sup>	15.07±0.56 <sup>§</sup>	15.45±0.61 <sup>§</sup>	12.24±2.62 <sup>§</sup>	17.49±0.44 <sup>§</sup>	18.45±0.69 <sup>§</sup>
72	64.43±2.55*	12.51±0.68 <sup>†</sup>	13.18±0.74 <sup>‡</sup>	43.84±5.00**	15.28±0.77 <sup>††</sup>	15.37±0.56 <sup>‡‡</sup>	48.66±8.51 <sup>§</sup>	13.20±0.77 <sup>§</sup>	13.80±0.86 <sup>§</sup>	36.92±4.41 <sup>§</sup>	15.78±0.50 <sup>§</sup>	16.02±0.42 <sup>§</sup>
96	118.24±6.22*	10.82±1.01 <sup>†</sup>	11.04±0.60 <sup>‡</sup>	86.98±9.84**	12.82±0.85 <sup>††</sup>	12.83±0.35 <sup>‡‡</sup>	99.75±9.99 <sup>§</sup>	11.81±0.61 <sup>§</sup>	12.25±0.14 <sup>§</sup>	76.87±9.31 <sup>§</sup>	13.62±0.31 <sup>§</sup>	13.36±0.28 <sup>§</sup>

ND= Not detected

Data are presented as the mean ± Standard deviation.

Different number of (\*), (†), (‡), (††) and (‡‡) symbols in the same row indicate that there is a significant differences (ANOVA, test Tukey,  $P \leq 0.05$ ) between data obtained from abalone fed without probiotic-supplemented diet (A) and with probiotics –supplemented– diet (B) for each age groups (a and b) at the same time (same row).



### Conclusion sur le chapitre III

Ce travail a permis d'étudier les réponses transcriptomiques de gènes candidats et cellulaires de cette espèce (pendant la phase du sevrage) à la vibriose en condition d'alimentation avec et sans bactéries probiotiques. Les transcrits étudiés dans cette étude sont directement impliqués dans des fonctions métaboliques clés de l'animal, parmi lesquelles figurent celles qui régulent la réponse immunitaire, ce qui suggère que les hémocytes constituent la cible principale du pathogène. Les résultats suggèreraient également que *V. parahaemolyticus* pourrait mettre en place des mécanismes de virulence qui lui permettrait d'échapper aux cellules immunitaires, probablement en raison de sa capacité à inhiber la réponse hémocytaire (dégradation des bactéries et production d'espèces réactives à l'oxygène-ROS), et de croître en présence d'hémocytes, tel que cela a été démontré chez l'homme infecté par *V. vulnificus* ou *V. cholerae* (Weintraub et al., 1994 ; Linkous & Oliver, 1999).

Pour valider cette hypothèse, des études de contacts cellulaires hémocytes-bactéries par cytométrie en flux et techniques immunohistochimiques permettraient de mettre en évidence une déficience ou une augmentation des hémocytes en présence des souches pathogènes. Ces observations pourraient indiquer que la déficience des hémocytes est la conséquence de l'inhibition par la bactérie, de leurs capacités de défense ou de la non reconnaissance de l'organisme pathogène qui pourrait être expliquée probablement par un échappement bactérien. Dans ce contexte, il est souhaitable d'étudier l'induction de la réponse immunitaire des hémocytes à travers la MAP Kinase p38 qui est une protéine-kinase impliquée dans une voie de signalisation utilisée dans la reconnaissance des bactéries à Gram négatives chez les mollusques. Cet acteur, est activé quand il est phosphorylé, et il peut induire la phagocytose et la production de ROS (Travers et al., 2009). Enfin, des systèmes de sécrétion de type III étant connu chez *V. parahaemolyticus*, ils pourraient également être recherchés. Leur importance dans l'inhibition des hémocytes, via le transport de molécules modifiant potentiellement les récepteurs membranaires liés à la reconnaissance ou des protéines perturbant la phagocytose, pourrait être étudiée suite à la conception de mutants déficients pour ces protéines

Par ailleurs, cette étude a démontré que le stress causé par des bactéries pathogènes augmente la mortalité des organismes hôtes, probablement par une immunosuppression induite par une susceptibilité accrue à la vibriose, comme cela a été démontré dans des études sur l'effet de *V. parahaemolyticus* chez l'orveau *H. diversicolor supertexta* (Cheng et al., 2004<sub>a</sub>; 2004<sub>b</sub>; 2004<sub>c</sub>; 2004<sub>d</sub> and 2004<sub>e</sub>).

Les orveaux nourris avec un régime d'alimentation enrichi en bactéries probiotiques semblent pouvoir résister à l'infection bactérienne car ils maintiennent la plupart des fonctions physiologiques primordiales : respiration cellulaire, métabolisme général et énergétique, réparation des dommages cellulaires, etc. En comparaison, les conditions physiologiques des individus sans alimentation additionnée de probiotiques semblent être diminuées, se traduisant par un métabolisme moins efficace pour générer l'énergie disponible pour le maintien des différentes fonctions métaboliques. La résistance à la vibriose chez l'organisme hôte peut être le résultat d'une amélioration dans les mécanismes de défense au niveau génomique, immunitaire et structurel comme le suggèrent Coustau & Theron (2004). D'autre part, les probiotiques pourraient exercer leur action aussi à d'autres niveaux : sur la microflore intestinale et plus directement sur la physiologie de l'animal. Dans le tractus intestinal, le probiotique agirait *via la* compétition-exclusion conduisant à des modifications (quantitatives et qualitatives) de la microflore bactérienne. Par là même, cela limiterait la présence et la concentration des pathogènes et par conséquent les risques d'infection. Au niveau nutritionnel, le probiotique confère une meilleure utilisation des carbohydrates alimentaires, abaisse les besoins énergétiques pour l'entretien du métabolisme de base et/ou constituerait une source supplémentaire d'éléments nutritifs essentiels à l'orveau. Une modification de la microflore intestinale par le probiotique pourrait également être l'origine de ces différents effets, mais cela reste à démontrer. Enfin le probiotique pourrait améliorer le statut antioxydant des animaux par l'augmentation du pouvoir réducteur et une meilleure utilisation des carbohydrates alimentaires disponibles. Enfin, le probiotique permettrait de maintenir le niveau des défenses antioxydantes chez des orveaux infectés par *V. parahaemolyticus* limitant ainsi l'action des molécules pro-antioxydantes. Cet effet protecteur

du probiotique en conditions pathologiques serait la conséquence soit de la réduction du niveau d'infection, soit d'une stimulation de l'immunité concomitante à l'élévation du pool antioxydant de l'animal.

Enfin, la réponse immunitaire de ce mollusque semble être fortement liée à la sensibilité des individus par rapport aux microorganismes pathogènes étudiés. Il est important de compléter cette étude par une analyse biochimique qui se focaliserait sur les protéines. Il serait donc opportun d'analyser l'activité de certaines enzymes potentiellement impliquées dans la réponse immunitaire et dans le métabolisme général et énergétique chez l'ormeau. Des dosages protéiques pourraient également être réalisés afin de connaître la concentration de certaines protéines des voies métaboliques clés, c'est-à-dire une étude protéomique sur des biomarqueurs révélés par l'étude transcriptomique, qui permettront d'appréhender la cascade de réactions et de voies métaboliques induites par ce stress infectieux et par l'action du probiotique dans l'hôte. Enfin, des études immunohistochimiques, basées sur la détection de protéines par des anticorps, pourraient permettre la localisation précise de l'action de certaines protéines. Il serait intéressant et pertinent de poursuivre la caractérisation sur d'autres gènes d'intérêt et leur polymorphisme. Ceci nous permettrait de rechercher ensuite la variabilité génétique liée à la survie en condition de vibriose avec ou sans alimentation additionnée de probiotiques pour la recherche d'allèles et de génotypes associés à la résistance ou à la sensibilité des organismes en condition de stress. Les facteurs phénotypiques de résistance (expression de gènes, immunomodulation, morphologie et traits de vie) pourraient être couplés au polymorphisme génétique de ces gènes pour établir la relation génotype/phénotype pendant leur cycle de vie.

# **Conclusions générales et perspectives de recherche**



# Conclusions générales

Les écosystèmes marins côtiers sont à la fois le siège d'une intense production biologique, le terrain d'une exploitation des ressources vivantes, et le réceptacle de divers contaminants d'origine anthropique. Ces divers facteurs génèrent des perturbations multiples dans ces milieux telles que la prolifération d'organismes pathogènes et l'apparition de maladies qui engendrent des mortalités différentielles des organismes. C'est dans ce contexte particulier que s'inscrit la problématique de cette thèse dont les travaux avaient pour objectif d'appréhender les interactions entre des polluants métalliques (principalement le cuivre), des bactéries pathogènes (du genre *Vibrio*) et des bactéries probiotiques sur le mollusque gastéropode marin d'importance économique, l'ormeau rouge *Haliotis rufescens*, en particulier pendant la phase ontogénique où ces mollusques changent d'alimentation (de microalgues à macroalgues), et plus précisément durant la période de sevrage. Cette période correspond à une étape physiologique critique de leur cycle de vie où de fortes mortalités différentielles sont observées chez les juvéniles sevrés (Flores-Aguilar et al., 2007) probablement en raison du changement du métabolisme digestif (dépression métabolique) (Viana 2002) et de la présence d'agents pathogènes opportunistes (Handler et al., 2005; Sawabe et al., 2007). L'halioticulture de cette espèce dans les eaux du Pacifique sud expose cette espèce à des fortes pressions anthropiques qui peuvent affecter la survie et le maintien de ce mollusque. Le développement massif des activités humaines sur la côte (industrielles, portuaires, touristiques et minières), à laquelle vient s'ajouter une augmentation démographique sur les zones littorales, ont considérablement intensifié les facteurs de stress dans ces régions (David et al., 2005 ; Lotze et al., 2006). Ceci a été réalisé à travers le développement de plusieurs approches faisant appel à différents niveaux d'intégration (moléculaire et cellulaire) et à différents champs disciplinaires, s'intéressant aussi bien à la régulation transcriptionnelle de certains gènes directement impliqués dans des fonctions métaboliques clés et dans les réponses immunitaires des organismes.

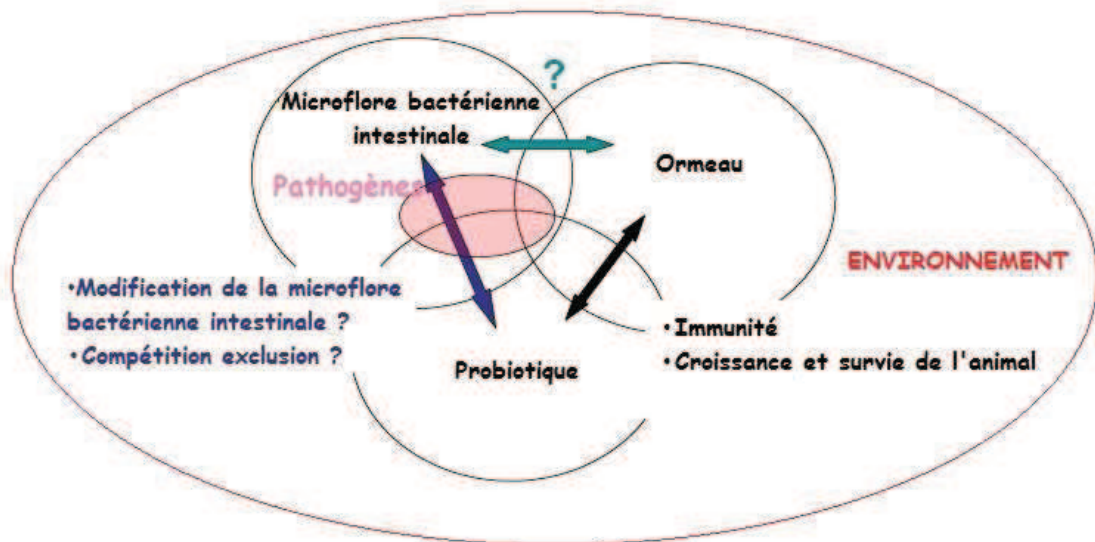
## Conclusions générales et perspectives de recherche

L'utilisation des bactéries probiotiques en aquaculture s'est avérée efficace en permettant l'amélioration de la résistance aux maladies, de la nutrition et /ou de la croissance des organismes cultivés (Irianto & Austin, 2002). Dans ce contexte, plusieurs travaux ont décrit l'utilisation de ces microorganismes dans l'élevage de poissons (Merrifield et al., 2010), de crustacés (Liu et al., 2010) et de mollusques (Macey & Coyne, 2005; 2006; Silva et al., 2011<sub>a</sub>). Actuellement, les études relatives à l'isolement et l'application de bactéries probiotiques dans la culture des ormeaux se sont intensifiées (Ten Doeschate & Coyne, 2008; Iehata et al., 2010; **Silva et al., 2011<sub>a</sub>**). Ainsi, il a été démontré que les probiotiques sont efficaces sur un grand nombre d'espèces marines pour favoriser la croissance, l'amélioration nutritionnelle, l'immunité et la survie. Ces résultats démontrent l'effet immunostimulant des probiotiques chez les ormeaux, ce qui confère une augmentation de la survie et le maintien des organismes dans les structures d'élevages (Mahlham et al., 2003; Macey & Coyne, 2005).

Dans un premier temps, la problématique de recherche de cette thèse était double :

- Confirmer les bénéfices sur les performances physiologiques apportés par le probiotique en conditions réelles d'élevage dans les fermes commerciales (**Article 1**), et en particulier savoir si son usage pouvait améliorer la résistance de *H. rufescens* aux vibrioses (**Article 4**).

Nous avons choisi de replacer l'étude dans un modèle d'interactions entre trois compartiments : l'ormeau, sa microflore bactérienne et les probiotiques. (Figure 19).



**Figure 19.** Schéma simplifié des interactions entre l'ormeau *H. rufescens*, sa microflore bactérienne intestinale et les probiotiques.

Dans un premier temps nous avons essayé de comprendre sur la base d'une première exploration et d'une évaluation expérimentale en éclosionerie commerciale de *H. rufescens*, les effets des probiotiques sur la survie et la croissance des organismes. Le changement des modalités trophiques à l'état juvénile (passage d'une nourriture de microalgues à macroalgues) constitue la période physiologique critique de ces organismes (dépression métabolique) et des mortalités de l'ordre de 5-16% sont observées. Ces résultats obtenus en conditions contrôlées ont permis de valider l'incorporation de bactéries probiotiques formées de trois souches (*Agarivorans albus* F1, *Vibrio* sp F15 et *Vibrio* sp C21) dans le tractus digestif des animaux pendant la phase critique de leur cycle de vie et a permis d'améliorer la survie et la croissance des jeunes ormeaux entre 15 et 25% dans les éclosioneries industrielles. Ces souches probiotiques ont la capacité de dégrader principalement l'agar et l'alginate de macroalgues (Souches F1 et F15) et d'inhiber des bactéries pathogènes telles que *Vibrio parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* (Souche C21). Ce processus a lieu grâce à la colonisation de ces bactéries sur la surface de la macroalgue *Macrocystis integrifolia* qui est utilisée comme un aliment traditionnel dans les éclosioneries d'ormeaux. De plus, l'analyse microbiologique a confirmé que les probiotiques se retrouvent généralement à une concentration relativement forte par rapport au reste de

## Conclusions générales et perspectives de recherche

la microflore bactérienne après la période de conditionnement bactérien sur la surface de *M. integrifolia*. Cette étude a souligné le rôle primordial des probiotiques sur la croissance et la survie de ces mollusques. En effet, une nourriture algale additionnée des microorganismes probiotiques augmente significativement ces deux paramètres de trait de vie (10 % sur la survie et de 16% sur la croissance) des ormeaux sur une période de 210 jours par rapport aux individus contrôles sans probiotiques. De plus, comme il a été souligné dans **l'article 1**, l'effet des probiotiques sur la croissance et survie reposerait sur une amélioration de l'utilisation de l'aliment par une stimulation de l'activité digestive de l'hôte et/ou par l'apport additionnel d'enzymes exogènes produites par le probiotique (Ten Doeschate & Coyne, 2008 ; Wang et al., 2008). Soulignons que les animaux nourris avec une nourriture additionnée de probiotiques entraîneraient une baisse de la production de ROS (Espèces Réactives à l'Oxygène). Enfin, une dernière hypothèse faisant intervenir l'apport de facteurs de croissance ou de nutriments essentiels par les bactéries probiotiques devrait également être considérée. L'augmentation du coefficient net d'efficacité alimentaire, qui signifie une meilleure transformation de l'aliment pour la croissance, semble aller dans le sens de cette hypothèse. Il est admis que la flore intestinale serait une source supplémentaire de nutriments et pourrait fournir des vitamines, des enzymes ou encore des acides aminés essentiels.

Par ailleurs, nous avons également montré grâce à des techniques de microbiologie (quantification des bactéries sur des milieux nutritifs solides), que les probiotiques restent dans le tractus digestif pendant une période de 16 jours à une concentration relativement forte par rapport au reste de la microflore bactérienne intestinale sans parvenir à s'y implanter définitivement après la fin de l'addition de probiotiques comme complément alimentaire. Cependant, sa présence régulière dans le tractus digestif des ormeaux pourrait influencer la microflore d'autant plus que, comme il a été démontré, cette dernière serait peu diversifiée. En effet, les interactions microbiennes dans le tractus digestif pourraient être déterminantes pour la colonisation des parois intestinales par la microflore autochtone comme cela a été postulé chez d'autres animaux aquatiques (Aubin et al., 2005). Ainsi comme nous l'avons discuté dans **l'article 1**, un effet de compétition-exclusion de la souche



## Conclusions générales et perspectives de recherche

probiotique peut être supposé. D'autre part, nous précisons aussi qu'un effet indirect du probiotique sur l'utilisation de l'aliment, le métabolisme et l'apport nutritionnel direct, *via* une modification de la flore intestinale, pourrait être **envisagé**.

Dans un second temps, une approche globale basée sur la méthode des banques soustractives a été appliquée pour étudier l'impact du cuivre sur des juvéniles d'*H. rufescens*, surtout dans la phase critique du cycle de vie de l'ormeau lorsqu'il change d'alimentation (Sevrage) en conditions expérimentales d'écloserie industrielle et pour tenter d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse de l'ormeau face au stress engendré par ce métal (**Article 2**). Cette méthode a permis d'identifier 108 transcrits potentiellement régulés (surexprimés ou inhibés) par ce métal et affectant différentes voies métaboliques clés des organismes. Parmi ces gènes, 14 codant pour des enzymes ou des protéines intervenant dans différentes voies physiologiques majeures ont été choisies pour des analyses d'expression génique, lesquelles ont permis de confirmer et de préciser les variations temporelles d'expressions induites par l'exposition au cuivre. Parmi ces séquences, des gènes codant pour des protéines liées aux voies métaboliques impliquées dans la communication cellulaire (Lpr1), le développement (vdg3), le métabolisme de l'énergie (ATP synthase), la respiration cellulaire (cytochrome oxydase 2), la réponse au stress (laminine), la régulation des protéines (facteur d'élongation 1-alpha et facteur d'élongation 2) et également des protéines classiquement connues pour être régulées par des stress métalliques telle que le Ferritine, ont été mises en évidence. Enfin, cette étude a permis d'obtenir des séquences partielles d'ADNc qui pourront par la suite permettre la caractérisation des gènes correspondants. Ces gènes pourront être utilisés comme indicateurs moléculaires d'exposition au stress. D'autre part, la présente étude a permis de mettre au point des paramètres de type immunologique ( Hémocytes Circulants Totaux (HCT), la phagocytose, l'activité de la phénoloxydase, et la production d'espèces réactives de l'oxygène) qui se sont avérés pertinents au cours des expériences réalisées dans l'écloserie industrielle de l'ormeau *H. rufescens* (**Article 3**). La fonctionnalité de ces indicateurs est essentielle pour comprendre l'effet de la pollution métallique par le cuivre dans le compartiment hémolymphatique responsable de l'intégrité physiologique de ces

## Conclusions générales et perspectives de recherche

invertébrés marins, en particulier dans la phase critique du développement ontogénétique de ces organismes (sevrage). Cette étude a permis l'obtention d'un certain nombre d'informations générales sur l'effet du cuivre dans l'immunomodulation de ces organismes. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une augmentation ou une diminution des activités hématocytaires correspond à une perturbation du système immunitaire et, comme signalé par d'autres auteurs, les polluants peuvent induire des modulations du système immunitaire (Oubella & Auffret, 1995). L'exposition au cuivre a provoqué une importante diminution dose et temps-dépendante des hématocytes circulants totaux et de la phagocytose. Cette diminution des cellules circulantes dose et temps-dépendante peut s'expliquer par deux processus physiologiques : d'une part, des mortalités différentielles possibles des hématocytes, et d'autre part la migration de ces cellules vers des zones de tissu sujettes aux dommages causés par le cuivre. Cette étude montre également que le cuivre peut augmenter de manière significative l'activité de la phénoloxydase (PO), enzyme jouant un rôle crucial dans l'immunité innée des mollusques et la production de molécules intermédiaires par la phénoloxydase qui pourrait générer l'anion superoxyde. La reconnaissance du contaminant par l'organisme comme une source de stress ou comme une molécule du non-soi provoquerait une activation des mécanismes de défense immunitaire. Ainsi, les PO pourraient alors être activées et/ou induites. De cette façon, la mesure de l'activité PO pourrait permettre de détecter une activation anormale du système de défense immunitaire. De plus, cette détection pourrait se faire de façon assez précoce, c'est-à-dire dès l'entrée du contaminant dans l'organisme. L'utilisation des PO comme biomarqueurs de stress environnemental permettrait donc de détecter une situation de stress avant que celle-ci ne provoque un impact grave dans l'organisme. Par ailleurs, il est probable que les niveaux d'exposition au cuivre augmenteraient indirectement les radicaux libres à l'origine du stress oxydatif. En outre, la séquestration des contaminants par les systèmes de détoxification peut conduire à une production importante de radicaux libres, provoquant par conséquent l'activation d'enzymes antioxydantes, pour le maintien de l'homéostasie au sein de l'organisme. De plus, du fait de ces propriétés oxydo-réductrices, et en se basant sur l'activité de PO et/ou les teneurs en contaminants des animaux, il apparaît que les PO pourraient jouer un rôle

## Conclusions générales et perspectives de recherche

antioxydant chez *H. rufescens*. Les hémocytes phagocytaires souffrent normalement de la flambée oxydative en raison de l'augmentation de la consommation d'oxygène et de la production d'espèces réactives de l'oxygène telles que l'anion superoxyde, molécule cytotoxique essentielle dans la réponse immunitaire chez les mollusques. Cette approche multi-marqueurs est originale, car des études similaires ne suivent généralement qu'un seul paramètre.

Les résultats obtenus dans le compartiment hemolymphatique et en particulier au niveau des hémocytes fournissent des renseignements sur le dysfonctionnement physiologique (mortalités, production des espèces réactives à l'oxygène....) provoqué par le stress métallique. Ce type de résultats est d'une importance capitale pour comprendre la stratégie adaptative et physiologique de ces organismes face à ce métal, particulièrement présent dans les eaux du Pacifique nord du Chili qui sont des zones potentiellement importantes pour la culture de cette espèce en « concessions maritimes » naturelles.

L'impact du cuivre nous renseigne sur l'effet régulateur de ce métal sur des transcrits associés à différentes voies métaboliques clés de ces animaux. Ces résultats sont pertinents et informatifs avant tout programme de cultures des ormeaux dans les concessions maritimes fortement impactées par ce métal dans le Pacifique au nord du Chili.

Dans un troisième temps, les différents travaux réalisés ont permis de comprendre les réponses transcriptomiques et cellulaires de l'ormeau *H. rufescens* (pendant la phase du sevrage) à la vibriose sous condition d'alimentation avec et sans bactéries probiotiques (**Article 4**), et d'émettre des hypothèses sur les mécanismes liés à la nutrition, à la survie et à la mortalité face aux pathogènes. Les transcrits étudiés dans cette étude sont directement impliqués dans des fonctions métaboliques clés de l'organisme, parmi lesquelles figurent celles qui régulent la réponse immunitaire ; ce qui suggère que les hémocytes constituent la cible principale du pathogène. Les résultats indiquent que les ormeaux exposés à des probiotiques et aux bactéries pathogènes (*V. parahaemolyticus*) souffrent d'une altération de la quantité d'hémocytes circulants. Nos résultats montrent également que la réponse

## Conclusions générales et perspectives de recherche

immunitaire de l'ormeau était moins altérée chez les sujets nourris avec des probiotiques, probablement en raison d'une résistance accrue à l'infection. Ceci est confirmé par une plus forte concentration de *V. parahaemolyticus* chez les animaux sevrés et juvéniles nourris sans probiotiques et soumis à une infection bactérienne. L'augmentation apparente des petits hémocytes observée en cytométrie en flux pourrait refléter une diminution du nombre d'autres cellules, y compris des hyalinocytes, ce qui suggère que le traitement probiotique pourrait favoriser la migration des cellules immunocompétentes de l'hémolymphe vers un autre compartiment de l'organisme, probablement vers les tissus infectés par *V. parahaemolyticus*, comme une conséquence de l'infection bactérienne expérimentale.

Les résultats suggèrent également (en particulier dans le traitement sans probiotiques) que *V. parahaemolyticus* pourrait mettre en place des mécanismes de virulence qui lui permettrait d'échapper aux cellules immunitaires, probablement en raison de sa capacité d'inhiber la réponse hémocytaire (dégradation des bactéries et production de ROS), et de croître en présence d'hémocytes, tel que cela a été démontré chez l'homme infecté par *V. vulnificus* ou *V. cholerae* (Weintraub et al., 1994 ; Linkous & Oliver, 1999).

Les ormeaux nourris avec un régime d'alimentation enrichie en bactéries probiotiques semblent pouvoir résister à l'infection bactérienne car ils maintiennent la plupart des fonctions physiologiques primordiales : respiration cellulaire, métabolisme général et énergétique, réparation des dommages cellulaires, etc. En comparaison, les conditions physiologiques des individus sans alimentation additionnée de probiotiques semblent être diminuées. Dans de telles situations, les animaux disposent d'un métabolisme moins efficace pour gérer l'énergie disponible pour le maintien des différentes fonctions métaboliques. La résistance à la vibriose chez l'organisme hôte serait le résultat d'une amélioration des mécanismes de défense au niveau génomique, immunitaire et structurelle comme le suggèrent les auteurs Coustau & Theron (2004).



## Conclusions générales et perspectives de recherche

Dans la cadre de nos études, des hypothèses peuvent être avancées concernant le rôle des probiotiques qui interviendraient à deux niveaux : sur la microflore intestinale et plus directement sur la physiologie de l'animal. Dans le tractus intestinal, le probiotique agirait *via la* compétition-exclusion conduisant à des modifications (quantitatives et qualitatives) de la microflore bactérienne. Ceci limiterait la présence et la concentration des pathogènes et donc les risques d'infection notamment par des substances antimicrobiennes produites par les probiotiques (peroxyde d'hydrogène, bactériocines, acides organiques par exemple). Au niveau nutritionnel, le probiotique permet une meilleure utilisation des carbohydrates alimentaires, abaisse les besoins pour l'entretien et/ou constituerait une source supplémentaire d'éléments nutritifs essentiels aux ormeaux. Une modification de la microflore intestinale par le probiotique pourrait également être à l'origine de ces différents effets, mais cela reste à démontrer. Enfin, le probiotique pourrait améliorer le statut antioxydant des animaux par une augmentation du pouvoir réducteur dû à une meilleure utilisation des carbohydrates alimentaires. L'hypothèse d'une action directe des probiotiques *via* ses capacités antioxydantes peut être avancée également. Enfin, le probiotique permettrait de maintenir le niveau des défenses antioxydantes chez les ormeaux infectées par *V. parahaemolyticus*. Cet effet protecteur du probiotique en conditions pathologiques est la conséquence de la réduction du niveau d'infection et de la stimulation de l'immunité concomitante à l'augmentation des capacités antioxydantes de l'animal.

# Perspectives de recherche

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse permet d'avancer un certain nombre de perspectives de travail afin d'approfondir nos connaissances sur les réponses moléculaires et physiologiques de l'Ormeau rouge *Haliotis rufescens* face à l'impact métallique, aux pathogènes et aux probiotiques. Trois orientations principales peuvent être développées:

(I) **Dans un premier temps**, il nous paraît essentiel de compléter les études concernant l'effet des probiotiques sur la survie et la croissance chez l'ormeau par des études enzymatiques en présence de probiotiques afin d'investiguer le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) il exercerait son action sur l'activité digestive de l'ormeau. De plus, des recherches complémentaires sont nécessaires pour déterminer la fréquence d'incorporation des bactéries probiotiques pour maintenir leur concentration stable dans le tube digestif de l'animal. En ce sens, il serait souhaitable d'approfondir la caractérisation de la flore intestinale à l'aide de techniques de métagenomique et DGGE afin de démontrer que les souches probiotiques peuvent influencer durablement la flore intestinale des ormeaux. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier les mécanismes de défenses antioxydantes chez des ormeaux sains ou infectés par des vibriens pathogènes, ce qui nous permettrait d'appréhender le rôle du probiotique sur la physiologie de *H. rufescens* (survie, différenciation ontogénique, croissance ...). Enfin, signalons qu'il serait intéressant d'élargir l'étude aux autres phases de l'ontogenèse de l'ormeau (larves, post-larves et géniteurs) pour avoir une vision globale de l'effet des probiotiques sur l'organisme.

(II) **Dans un second temps**, la réponse moléculaire, cellulaire et physiologique des animaux face à l'impact métallique, aux pathogènes et aux probiotiques doit être approfondie par les études d'autres transcrits impliqués dans les mécanismes de détoxification métallique, la réponse immunitaire, le métabolisme général et énergétique et la réponse au stress oxydatif. Dans ce sens, il serait souhaitable de coupler des approches transcriptomiques et protéomiques (enzymatique et

## Conclusions générales et perspectives de recherche

immunohistochimiques) afin de comprendre les réponses physiologiques des organismes à travers les cascades de réactions et de voies métaboliques induites par ces différents facteurs. Enfin, il serait intéressant de poursuivre les études sur la réponse des Ormeaux au plan génétique par la caractérisation du polymorphisme de gènes d'intérêt, afin de cerner la résistance ou la sensibilité des animaux en condition de stress multiples et pouvoir établir la relation génotype/phénotype pendant leur cycle de vie.

(III) **Dans un contexte plus général**, il serait intéressant d'effectuer des expériences multifactorielles de triple stress (Cuivre x bactérie pathogène x probiotique) sur *H. rufescens*. Cette démarche expérimentale pourrait apporter des renseignements sur l'impact des stress multiples sur la réponse des organismes à différents niveaux d'intégration biologique (moléculaire, cellulaire, individuel et populationnelle). Ceci est indispensable pour discriminer l'influence de chaque étape ontogénique de l'organisme et déterminer des corrélations avec les différentes sources de stress identifiées.

# Références bibliographiques



- Abel, P., (1976). Effect of some pollutants on the filtration rate of *Mytilus*. Marine Pollution Bulletin 7: 228–231.
- Aberoumand, A., (2010). Occurrence and characterization of potentially pathogenic *Vibrio* species in seafood products and mariculture systems. World Journal of Fish & Marine Sciences 2 (5): 376-382.
- Acevedo, J., Orellana, F., Guíñez, R., (2010). Evaluación experimental de la toxicidad de cobre *in situ* sobre la fauna asociada a *Perumytilus purpuratus* (Bivalvia: Mytilidae), un ingeniero ecosistémico. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45 (3): 497-505.
- Acharya, R., Saify, T., (2012). Copper toxicity on cell morphometry of *Scenedesmus quadricauda* Chodat. Indian Journal of Applied & Pure Biology 27(2): 165-171.
- Adams, M., Moss, M., (2008). Bacterial agents of food borne illness In: Food Microbiology (3rd edn.) RSC, Surrey UK 182–269 pp.
- Adeleye, I., Daniels, F., Enyinnia, V., (2010). Characterization and Pathogenicity Of *Vibrio Spp.* Contaminating Seafoods In Lagos, Nigeria. Internet Journal of Food Safety 12: 1-9.
- Aderem. A., Ulevitch, R., (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature 406: 782-787.
- Aguirre-Guzman., (1992). Uso de probióticos en Acuicultura. In: Cruz- Suárez LE, Ricque D, Mendoza R (Eds). Avances en Nutrición Acuicola. 2do Simposio Internacional sobre Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. Facultad de Ciencia Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. Pp. 332-337.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H., Jain, S., Athar, M., Raisuddin, S., (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of papermill effluent exposure. Biochimica et Biophysica Acta 1523: 37-48.
- Alapide-Tendencia, E., Dureza, L., (1997). Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. Aquaculture 154: 107-114.
- Allsopp, M., Lafarga-De la Cruz., Flores-Aguilar, R., Watts, E., (2011). Abalone Culture. En: Recents Advances and New species in aquaculture. First edition. Ravi R. Fotedar & Bruce. F. Phillips (Eds). John Wiley & Sons, Ltd. UK. 231-251.
- Almeida, E., Bairy, A., Medeiros, M., Di Mascio, P., (2003). Effects of trace metal and exposure to air on serotonin and dopamine levels in tissues of the mussel *Perna perna*. Marine Pollution Bulletin 46:1485-1490.
- Alves de Almeida, E., Dias, A., de Melo, P., Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita, L., Machado, C., Manso, F., Ronsein, G., Sigolo, C., Barbosa, C., Gracioso, A., Gennari, M., Di Mascio, P., (2007). Review: Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. Comparative Biochemistry & Physiology, Part A 146:588-600.
- Aly, SM., Mohamed, MF., John, G., (2008). Effects of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Research 39: 647-656.
- Andlid, T., Vazquez-Juarez, R., Gustafsson, L., (1995). Yeast colonizing the intestine of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and turbot, *Scophthalmus maximus*. Microbial Ecology 30:321-334.
- Anguinado-Beltran, C., Searcy-Bernall, R., Lizarraga-partida, M., (1998). Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. Diseases of Aquatic Organisms 33:119-122.
- Ahnert, A., Borowski, C., (2000). Environmental risk assessment of anthropogenic activity in the deep sea. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 7: 299-315.

- Araújo, C., Diz, F., Lubián, L., Blasco, J., Moreno-Garrido, I., (2010). Sensitivity of *Cylindrotheca closterium* to copper: Influence of three test endpoints and two test methods. *Science of the Total Environment* 408: 3696-3703.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbe, L., Lebrun, L., (2005). Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research* 36: 758–767.
- Avendaño, R., Riquelme, C., Escribano, R., Reyes, N., (2001). Survival and growth of post *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) in English Bay, Chile: effects of the origin, distribution in the bay and bacterioflora larval. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 669-679.
- Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., (2010). Determinación de las condiciones de crecimiento in vitro de una cepa probiótica (*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*) aislada del tracto intestinal de terneros (*Bos taurus*). *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1 (1): 58-69.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews* 198:149-68.
- Baffone, W., Casaroli, A., Campana, R., Citterio, B., Vittoria, E., Pierfelici, L., Donelli, G., (2005). ‘In vivo’ studies on the pathophysiological mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* TDH+—induced secretion. *Microbial Pathogenesis* 38: 133-137.
- Balcazar, J., (2003). Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.
- Balcazar, L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Muzquiz, J., (2004). Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 19: 239-242.
- Balcazar, J., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J., (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114:173-186.
- Baldwin, D., Sandahl, J., Labenia, J., Scholz, N., (2003). Sublethal effects of copper on Coho Salmon: Impacts on nonoverlapping receptor pathways in the peripheral olfactory nervous system. *Environmental Toxicology & Chemistry* 22 (10): 2266-2274.
- Baqueiro-Cárdenas, E., Borabe, L., Goldaracena-Islas, C., Rodriguez-Navarro, J., (2007). Los moluscos y la contaminación. Una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78: 1-7.
- Bassler, B., Wright, M., Showalter, R., Silverman, L., (1993). Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology* 9(4): 773-786.
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J., Figueras, M., (2010). Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports* 2: 34-43.
- Bergh, O., (1995). Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L, inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. *Journal of Fish Diseases* 18:31-40.
- Bjornsdottir, R., Karadottir, E., Johannsdottir, J., Thorarinsdottir, E., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., Gudmundsdottir, B., (2010). Selection of bacteria and the effects of bacterial treatment of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) eggs and larvae. *Aquaculture* 302:219-227.
- Blanchard, J., Grosell, M., (2006). Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish, *Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? *Aquatic Toxicology* 80: 131-139.
- Bourdineaud, J., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Moreau, J., (2006). Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie* 88(11): 1787-1792.

## Références bibliographiques

- Boyd, E., Moyer, K., Shi, L., Waldor, M., (2000). Infectious CTXphi and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infection & Immunity* 68: 1507-1513.
- Broberg, C., Zhang, L., Gonzalez, H., Laskowski-Arce, M., Orth, K., (2010). A *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity. *Science* 329:1660–1662.
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H.F., Fournier, M., (2000). Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology* 142: 145-156.
- Bruhn, J., Nielsen, K., Hjelm, M., Hansen, M., Bresciani, J., Schulz, S., Gram, L., (2005<sub>a</sub>). Ecology, inhibitory activity, and morphogenesis of a marine antagonistic bacterium belonging to the *Roseobacter* clade. *Applied & Environmental Microbiology* 71:7263-7270.
- Bruhn, J., Dalsgaard, I., Nielsen, K., Buch, C., Larsen, J.L., Gram, L., (2005<sub>b</sub>). Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Disease Aquatic Organisms* 65:43-52.
- Bryan-Walker, K., Leung, T., Poulin, R., (2007). Local adaptation of immunity against a trematode parasite in marine amphipod populations. *Marine Biology* 152: 687-695.
- Buggé, D., Hégaret, H., Wikfors, G., Allam, B., (2007). Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish & Shellfish immunology* 23: 188-196.
- Burke, D., (2005). Under the weather. *Climate, Ecosystems, and Infectious Disease*. Committee on Climate Ecosystems, Infectious Disease and Human Health. National Academy Press, 2101 Constitution Ave., N.W., Washington, DC 20418: 1-44.
- Cáceres, P., Gotteland, M., (2010). Alimentos Probióticos en Chile: ¿Qué cepas y qué propiedades saludables?. *Revista Chilena de Nutrición* 37 (1): 97-109.
- Cai, J., Han, H., Song, Z., Li, C., Zhou, J., (2006<sub>a</sub>). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased postlarval abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (Lischke). *Aquaculture Research* 37: 1222–1226.
- Cai, J., Han, Y., Wang, Z., (2006<sub>b</sub>). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities. *Aquaculture* 257: 161-166.
- Cai, J., Li, J., Thompson, K., Li, C., Han, H., (2007). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Basic Microbiology* 47: 84-86.
- Carvalho, C., Fernandes, M., (2008). Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry & Physiology A* 151: 437-442.
- Castro-Barrera, T., Monroy-Dosta, M., Castro-Mejía, J., Lara-Andrade, R., Castro-Mejía, G., (2011). Efecto de cuatro probióticos en el crecimiento y la sobrevivencia de *Carassius auratus*. *Ciencia Pesquera* 19 (1): 21-28.
- Chen, J., Lin, C., (2001). Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 192: 55-65.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B., Hughson, F., (2002). Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. *Nature* 415:545-549.
- Chen, R., Zhou, Z., Cao, Y., Bai, Y., Yao, B., (2010). High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus sp.* B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microbial Cell Factories* 9:39.

- Cheng, T.,(1988<sub>a</sub>). *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: Total and differential cell counts. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 207- 214.
- Cheng, T.,(1988<sub>b</sub>). *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytic and endocytic indices. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 215- 220.
- Cheng, W., Hsiao, I., Hsu, C., Chen, J., (2004<sub>a</sub>). Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 17(3): 235-243.
- Cheng, W., Juang, F., Chen, J., (2004<sub>b</sub>). The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 295-306.
- Cheng, W., Li, C., Chen, J., (2004<sub>c</sub>). Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 232: 103-115.
- Cheng, W., Hsiao, I., Chen, J., (2004<sub>d</sub>). Effect of ammonia on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 17: 193-202.
- Cheng, W., Hsiao, I., Chen, J., (2004<sub>e</sub>). Effect of nitrite on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 157-164.
- Cheng, L., Huang, J., Shi, C., Thompson, K., Mackey, B., Cai, J., (2008). *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Mass Mortality of Postlarval Abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (L.), in Sanya, China. *Journal of the World Aquaculture Society* 39 (6): 746-757.
- Chiu, C., Guu, Y., Liu, C., Pan, T., Cheng, W., (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 23 (2): 364-77.
- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., Burighel, P., (1998). Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 40: 160-165.
- Coles, J., Pipe, P., (1994). Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* 4:337-52.
- Coles, J., Farley, S., Pipe, R., (1994). Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 30: 367-379.
- Coles, J., Farley, S., Pipe, R., (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 59-65.
- Conroy, P., Hunt, J., Anderson, B., (1996). Validation of a short-term toxicity test endpoint by comparison with longer-term effects on larval red abalone *Haliotis rufescens*. *Environmental Toxicology & Chemistry* 15(7): 1245-1250.
- Cordova, J., Astorga, J., Silva, W., Riquelme, C., (2002). Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during 1997-1998 Chilean outbreaks. *Biological Research* 35: 433-440.
- Cornelis, R., Borguet, F., De Kimpe, J., (1993). Trace elements in medicine. *Analytica Chimica Acta* 283: 183-189.
- Coustau, C., Theron, A., (2004). Resistant or resisting: seeking consensus terminology. *Trends in Parasitology* 20: 209-210.
- Couture, P., Kumar, P., (2003). Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 64, 107-120.
- Coyne, V., (2011). The importance of ATP in the immune system of molluscs. *Invertebrate Survival Journal* 8: 48-55.
- Crain, C., Kroeker, K., Halpern, B., (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology letters* 11: 1304-1315.



## Références bibliographiques

- Croxatto, A., Chalker, V., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A., Williams, P., Cámara, M., Milton, D., (2002). VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 184:1617-1629.
- Currie, R., (2012). Toxicogenomics: The challenges and opportunities to identify biomarkers, signatures and thresholds to support mode-of-action. *Mutation Research* 746: 97-103.
- Dalmin, G., Kathiresan, K., Purushothaman, A., (2001). Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology* 39: 939-942.
- Daniels, N., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A., Rosario, L., Baldwin, T., Kingsley, T., Puhr, N., Wells, J., Angulo, F., (2000). Emergence of a new O3:K6 *V. parahaemolyticus* serotype in raw oyster. *JAMA* 284: 1540-1545.
- Das, S., Lyla, P., Khan, S., (2006). Application of estreptomyces as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). *The Israeli Journal of Aquaculture*. 58: 198-204.
- Davis, G., Faulkner, K., Halvorson, W., (1994). Ecological monitoring in Channel Islands National Park, California in The fourth California islands symposium: update on the status of resources, W. L. Halvorson, editor. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara, CA, 465-482 pp. <http://www.nature.nps.gov/im/>
- Debelius, B., Forja, J., DelValls, A., Lubián, L., (2010). Toxic effect of copper on marine picophytoplankton populations isolated from different geographic locations. *Scientia Marina* 74S1: 133-141.
- De Decker, S., Saulnier, D., (2011). Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 691-699.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., Verstraete, W., (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240:69-88.
- Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., (2006). Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* Isolates. *Applied & Environmental Microbiology* 72: 6419-6423.
- De Paola, A., Kayser, C., Bowers, J., Cook, D., (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters following outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Applied & Environmental Microbiology* 66: 4649-4654.
- De Zoysa, M., Nikapitilla, Ch., Oh, Ch., Lee, Y., Whang, I., Lee, J., Choi, Ch., Lee, J., (2011). Microarray analysis of gene expression in disk abalone *Haliotis discus discus* after bacterial challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 611-673.
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., Lorenzini, P., Ballaré, M., Montino, F., Orsello, M., Sartori, M., Garelo, E., Carmagnola, S., Pagliarulo, M., Capurso, L., (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive & Liver Disease* 38(2):248-255.
- Department of Fish and Game (DFG)., (2003). Abalone Recovery and Management Plan. State of California, Resources Agency. <http://www.dfg.ca.gov/mrd/armp/index.html>, December 7, 2003.
- Diggles, B., Oliver, M., (2005). Diseases of cultured paua (*Haliotis iris*) in New Zealand. In: Walker, P., Lester, R., Bondad-Reantaso, M., (eds.) Diseases in Asian Aquaculture V. Proceedings of the 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. pp. 275-287.

- Dimitroglou, A., Merrifield, D., Carnevali, O., Picchietti, S., Avella, M., Daniels, C., Güroy, D., Davies, S., (2011). Review. Microbial manipulations to improve fish health and production – A Mediterranean perspective. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 1-16.
- Doherty, C., (2007). Host–pathogen interactions: the role of iron. *Journal of Nutrition* 137: 1341-1344.
- Donaghy, L., Hong, H., Lambert, C., Park, H., Shim, W., Choi, K., (2010). First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 87-97.
- Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A., K, Soudant, P., (2012). Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement. *PLoS ONE* 7(10): e46594. doi:10.1371/journal.pone.0046594
- Dong, Y., Zhang, L., (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of Microbiology* 43: 101-109.
- Dong, Y., Wang, L., Zhang, L., (2007). Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362:1201-1211.
- Donovan, D., Baldwin, J., Carefoot, T., (1999). The contribution of anaerobic energy to gastropod crawling and a re-estimation of minimum cost of transport in the abalone, *Haliotis kamtschatkana* (Jonas). *Journal of Experimental Biology & Ecology* 235: 273-284.
- Douillet, P., Langdon, C., (1993). Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Biological Bulletin* 184:36-51.
- Douillet, P., Langdon, C., (1994). Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119(1): 25-40.
- Drake, S., Elhanafi, D., Bang, W., Drake, M., Green, D., Jaykus, L., (2007). Validation of a green fluorescent protein labeled strain of *Vibrio vulnificus* for use in the evaluation of post-harvest strategies for handling of raw oysters. *Applied & Environmental Microbiology* 72 (11): 7205-7211.
- Ellis, R., Parry, H., Spicer, J., Hutchinson, T., Pipe, R., Widdicombe, S., (2011). Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 1209-1222.
- Elston, R., Lockwood, G., (1983). Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Fish Disease* 6(2): 111-128.
- Elston, R., (1999). Health Management, Development and Histology of Seed Oysters. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 110 pp.
- Enos-Berlage, J., Guvener, Z., Keenan, C., McCarter, L., (2005). Genetics determinants of biofilms development of opaque and traslucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology* 55: 1160-1182.
- Enriquez, R., Villagrán, R., (2008). La experiencia del desarrollo del cultivo de abalón (*Haliotis spp*) en Chile: oportunidades y desafíos. *Revue Scientifique et Technique* 27: 103-112.
- Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blusta, R., De Boeck, G., (2011). Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquatic Toxicology* 103: 112-120.
- FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk and live latic acid bacteria. FAO/WHO, Córdoba, Argentina.
- Farmer, J., Hickman-Brenner, F., (2006). The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E., (eds), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd ed., release 3.7. Springer- Verlag, Nueva York.

- Farto, R., Armada, S., Montes, M., Guisande, J., Perez, M., Nieto, T., (2003). *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). Journal of Invertebrate Pathology 83: 149-156.
- Farzanfar, A., (2004). The use of probiotic in shrimp aquaculture. FEMS Immunology & Medical Microbiology 48: 149-158.
- Fathallah, S., Medhioub, M., Medhioub, A., Kraiem, M., (2010). Toxicity of Hg, Cu and Zn on early developmental stages of European clam (*Ruditapes decussatus*) with potential application in marine water quality assessment. Environmental Monitoring & Assessment 171: 661-669.
- Fjellheim, A., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I., Vadstein, O., (2010). Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. Veterinary Microbiology 144:153-159.
- Flores-Aguilar, R. A., Gutiérrez, A., Ellwanger, A., Searcy-Bernal, R., (2007). Development and current status of abalone aquaculture in Chile. Journal of Shellfish Research 26 (3):705-711.
- Flye-Sainte, M., Pouvreau, S., Paillard, C., Jean, F., (2007). Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Journal of Experimental Marine Biology & Ecology 349: 378-389.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2010). FAO Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. Available from <http://www.fao.org/figs/servelet>.
- Fonseca, V., Serafim, A., Company, R., Bebianno, M., Cabral, H., (2009). Effect of copper on growth, condition indices and biomarker response in juvenile sole *Solea senegalensis*. Scientia marina 73 (1): 51-58.
- Franchini, A., Conte, A., Ottaviani, E., (1995). Nitric oxide: An ancestral immunocyte effector molecule. Advances in Neuroimmunology 5: 463-478.
- Frias-Espericueta, M., Castro-Longoria, R., Barron-Gallardo, G., Clsuna-Lopez, J., Abad-Rosales, S., Paez-Osuna, F., Voltolina, D., (2008). Histological changes and survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles with different copper concentrations. Aquaculture 278: 97-100.
- Fuenzalida, L., Armijo, L., Zabala, B., Hernández, C., Rioseco, M., Riquelme, C., Espejo, R., (2007). *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. International Journal of Food Microbiology 117: 270-275.
- Fuller, R., (1989). Probiotics in man and animals. AFRC, Institute of Food Research, Reading Laboratory. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.
- Fuqua, C., Greenberg, E., (2006). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nature reviews Molecular Cell Biology 3: 685-695.
- Fukui, Y., Saitoh, S., Sawabe, T., (2010). Environmental determinants correlated to *Vibrio harveyi*-mediated death of marine gastropods. Environmental Microbiology 12 (1): 124-133.
- Galloway, T., Depledge, M., (2001). Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology 10: 5-23.
- García, Y., García, Y., Bocourt, Ramón., (2011). Los probióticos como alimento funcional., Artículos de nutrición. PV ALBEITAR. Available from <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10233/ARTICULOS-NUTRICION/probiticos-alimento-funcional.html>
- Garcia-Sampaio, F., de Lima, C., Bichara, L., Tie, E., Kalinin, A., Barreto, A., Tadeu, L., (2012). Antioxidant defenses and biochemical changes in the neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus*: Responses to single and combined copper and hypercarbia exposure. Comparative Biochemistry & Physiology, Part C 156: 178-186.

- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., Nicolas, J., (2007). Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology* 53: 187–196.
- Gatesoupe, F., (1997). Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10:239-246.
- Gatesoupe, F., (1999). The use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147- 165.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A., Le Roux, F., (2004). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 65-74.
- Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., (2008). Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Reviews in Fisheries Sciences* 16: 133-156, 2008.
- Gibson, L., Woodworth, J., George, A., (1998). Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169:111-120.
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M., (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology & Biotechnology* 81:591-606.
- Girón-Pérez, M., (2010). Relationship between innate immunity in bivalves molluscs and environmental pollution. *Invertebrate Survival Journal* 7: 147-156.
- Gode-Potratz, C., McCarter, L., (2011). Quorum sensing and Silencing in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 193 (16): 4224-4237.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., (1998). Selection of Probiotic Bacteria for Use in Aquaculture. In: FLEGEL, T.W. (ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology, Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum Chiangmai, Thailand, Sección Probiotics and Immunostimulants*, p 174.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Tumbull, F., (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.
- Gomez-Gil, B., Thompson, F., Thompson, C., Garcia-Gasca, A., Roque, A., Swings, J., (2004). *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 54: 261-265.
- Gomez-Leon, J., Villamil, L., Salger, S., Sallum, R., Remacha-Trivino, A., Leavitt, D., Gomez-Chiarri, M., (2008). Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 79: 95-105.
- Gomez-Mendikute, A., Etxeberria, A., Olabarrieta, I., Cajavaville, M., (2002). Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo[a]pyrene. *Marine Environmental Research* 54: 431-436.
- Gomez, R., Geovanny, D., Balcazar, J., Shen, M., (2007). Probiotics as control agents in Aquaculture. *Journal of Ocean University of China* 6: 76-79.
- González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M., Vergara, J., Cabello, F., Romero, J., Espejo, R., (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging Infectious Diseases* 11: 129-131.
- Gopalakrishanan, S., Thilagam, H., Huang, W., Wang, K., (2009). Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo[a]pyrene. *Chemosphere* 75: 389-397.
- Gopalakrishanan, S., Huang, W., Wang, Q., Wu, M., Liu, J., Wang, K., (2011). Effects of tributyltin and benzo[a]pyrene on the immune-associated activities of hemocytes and recovery responses in the gastropod abalone, *Haliotis diversicolor*. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part C* 154: 120-128.



- Gorski, J., (2006). The effects of trace metals on the Australian Abalone *Haliotis rubra*. PhD thesis. Biotechnology and Environmental Biology. School of Applied Sciences. RMIT University. Melbourne, Australia.
- Gorski, J., Nugegoda, D., (2006<sub>a</sub>). Sublethal toxicity of trace metals to larvae of the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. Environmental Toxicology and Chemistry 25(5): 1360-1367.
- Gorski, J., Nugegoda, D., (2006<sub>b</sub>). Toxicity of trace metals to juvenile abalone, *Haliotis rubra* following short term exposure. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology 77(5): 732-740.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber I., Nielsen, T., (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Applied & Environmental Microbiology 65:969-973.
- Gram, L., Lovold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., Spanggaard, B., (2001). *In vitro* antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. Aquaculture 199:1-11.
- Gram, L., Ringø, E., (2005). Prospects of fish probiotics. In Holzapfel, W., Naughton, P., (ed.) Microbial Ecology in Growing Animals. 379-417. Elsevier Limited.
- Granados-Amores, A., Campa-Córdova, A., Araya, R., Mazón-Suástegui, J., Saucedo, P., (2012). Growth, survival and enzyme activity of lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) spat treated with probiotics at the hatchery. Aquaculture Research 43: 1335-1343.
- Grossart, H., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M. & Brinkhoff, T., (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. Environmental Microbiology 7: 860-873.
- Guarner, F., Requena, T., Marcos, A., (2010). Consensus statements from the Workshop “Probiotics and Health : Scientific Evidence”. Artículo especial. Nutrición Hospitalaria 25 (5): 700-704.
- Gueimonde, M., Salminen, S., (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. Digestive & Liver Disease 38(2):242-247.
- Gundacker, C., (1994). Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. Chemosphere 38:3339-3356.
- Guvener, Z., McCarter, L., (2003). Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology 185: 5431-5441.
- Hadjoudja, S., Vignoles, C., Deluchat, V., Lenain, J., Le Jeune, A., Baudu, M., (2009). Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. Aquatic Toxicology 94: 255-264.
- Hahn K. O., (1989). Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. C.R.C. Press. Boca Raton, Florida. 349 pp.
- Han, F., Wang, X., Yao, Y., Wang, Z., (2010). Molecular characterization of Ran gene up-regulated in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) immunity. Fish & Shellfish Immunology 29: 327-333.
- Han, Y., Li, X., Qi, Z., Zhang, X., Bossier, P., (2010). Detection of different quorum-sensing signal molecules in a virulent *Edwardsiella tarda* strain LTB-4. Journal of Applied Microbiology 108:139-147.
- Handler, J., Carson, J., Donachie, L., Gabor, L., Taylor, D., (2002). Bacterial infection in Tasmanian farmed abalone: causes, pathology, farm factors and control options. (Abstract). Handbook and Abstracts, Fifth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Queensland, Australia, 24-28 November 2002. Pg. 139.

## Références bibliographiques

- Handler, J., Carson, J., Donachie, L., Gabor, L., Taylor, D., (2005). Bacterial Infection in Tasmanian Farmed Abalone: Causes, Pathology, Farm Factors and Control Options. Diseases in Asian Aquaculture Walker, P., Lester, R., Bondad-Reantaso, M., (eds). Fish Health Section.
- Hanlon, R., Forsythe, J., Cooper, K., Dinuzzo, A., Folse, D., Kelly, M., (1984). Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses Journal of Invertebrate Pathology 44: 67-83
- Hannan, M., Bamber, S., Moody, J., Galloway, T., Jones, M., (2009). Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. Aquatic Toxicology 92: 187-194.
- Hai, N.V., Buller, N., Fotadar, R., (2009). Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). Aquaculture Research 40: 590-602.
- Harth, E., Matsuda, L., Hernández, C., Rioseco, M., Romero, J., González-Escalona, N., Martínez-Urtaza, J., Espejo, R., (2009). Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks, Southern Chile. Emerging Infectious Diseases 15 (2):163-168.
- Hasegawa, H., Lind, E., Boin, M., Hase, C., (2008). The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. Applied & Environmental Microbiology 74: 4101-4110.
- Heidelberg, J., Heidelberg, K., Colwell, R., (2002). Bacteria of the gamma-subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. Applied & Environmental Microbiology 68: 5498-5507.
- Heitmann, I., Jofré, L., Hormazábal, C., Olea, A., Vallebuona, C., Valdés, C., (2005). Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. Revista Chilena de Infectología 22 (2): 131-140.
- Henke, J., Bassler, B., (2004<sub>a</sub>). Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology 186 (20): 6902-6914.
- Henke, J., Bassler, B., (2004<sub>b</sub>). Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology 186 (20):3794-3805.
- Heral, M., (1993). Why carrying capacity models are useful tools for management of bivalve molluscs culture, in: Dame, R.F. (Ed.), Bivalve filter feeders. Springer-Verlag, Berlin, pp. 455-477.
- Hernández, C., Ulloa, J., Vergara, J., Espejo, R., Cabello, F., (2005). Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. Revista Médica de Chile 133: 1081-1088.
- Hervio-Heath, D., Colwell, R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J., Pommepuy, M., (2002). Occurrence of pathogenic vibrios in the coastal areas of France. Journal of Applied Microbiology 92: 1123-1135.
- Hider, R., Kong, X., (2010). Chemistry and biology of siderophores. Natural Product Reports 27:637-657.
- Hiyoshi, H., Kodama, T., Iida, T., Honda, T., (2010). Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. Infection & Immunity 78:1772-1780.
- Hlady, W., Klontz, K., (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1991-1993. The Journal of Infectious Diseases 173: 1176-1183.
- Holmstrøm, K., Gram, L., (2003). Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2, using RNA-arbitrarily primed PCR. Journal of Bacteriology 185:831-842.

## Références bibliographiques

- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handler, J., Benkendorff, K., (2007). Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology* 22: 363-379.
- Huang, C., Liu, P., Lee, K., (2001). Withering syndrome of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and associated with thermal induction. *Z Naturforsch* 56(9-10): 898-901.
- Hunt, J., Anderson, B., (1993). From research to routine: A review of toxicity testing with marine molluscs. In: Landis, W.G., Hughes, J.S. & Lewis, M.A. (ed.) *Environmental Toxicology and Risk Assessment* ASTM STP1179. American Society for Testing and Materials Philadelphia, USA, pp. 320-339.
- ICMSF., (1996). *Vibrio cholerae; V. parahaemolyticus; V. vulnificus*. In: Roberts, T., Baird-Parker, A., Tompkin, R., (eds.) *Microorganisms in Foods Characteristics of Microbial Pathogens* Chapter 22-24. Blackie Academic and Professional London. 414-439 pp.
- Iehata, S., Inagaki, T., Okunishi, S., Nakano, M., Tanaka, R., Maeda, H., (2009). Colonization and probiotics effects of lactic acid bacteria in the gut of the abalone *Haliotis gigantea*. *Fisheries Sciences* 75: 1285-1293.
- Iehata, S., Inagaki, T., Okunishi, S., Nakano, M., Tanaka, R., Maeda, H., (2010). Improved gut environment of abalone *Haliotis gigantea* through *Pediococcus* sp. Ab1 treatments. *Aquaculture*. 305, 59-65.
- Ino T., (1980). Fisheries in Japan, abalone and oyster. Japan Marine Products Photo Materials Association, Tokyo, Japan. 165 pp.
- Irianto, A., Austin, B., (2002a). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25:633-642.
- Ittoop, G., George, K., George, R., Sobhana, K., Sanil, N., Nisha, P., (2009). Effect of copper toxicity on the hemolymph factors on the Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). *Indian Journal of Fisheries* 56 (4): 301-306.
- Jacques, S., McCarter, L., (2006). Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 188:2625-2635.
- Jay, J., Loessner, M., Gonden, D., (2005). Foodborne gastroenteritis caused by *Vibrio*, *Yersinia* and *Campylobacter* species. In: *Modern Food Microbiology*. (7<sup>th</sup> edn.) Chapter 28. Springer Science New York. 657-664 pp.
- Jayaprakash, N., Pai, S., Anas, A., Preetha, R., Philip, R., Singh, I., (2005). A marine bacterium, *Micrococcus* MCCB 104, antagonistic to vibrios in prawn larval rearing systems. *Diseases of Aquatic Organisms* 68:39-45.
- Jena, S., Behera, M., Dandapat, J., Mohanty, N., (2009). Non-enzymatic antioxidant status and modulation of lipid peroxidation in the muscles of *Labeo rohita* by sub-lethal exposure of CuSO<sub>4</sub>. *Veterinary Research Communications* 33: 421-429.
- Jorquera, M., Riquelme, C., Loyola, L., Muñoz, F., (2000). Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture International* 7:433-448.
- Jyothirmayi, G., Rao, P., (1987). Diagnostic value of haemolymph enzyme activity profile in infected snail *Lymnaea lutiola* (Lamarck). *Indian Journal of Experimental Biology* 25: 132-134.
- Julie, D., Solen, L., Antoine, V., Jaufrey, C., Annick, D., Dominique, H., (2010). Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll *a*. *Environmental Microbiology* 12 (4): 929-937.
- Karaolis, D., Johnson, J., Bailey, C., Boedeker, E., Kaper, J., Reeves, P., (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 95: 3134–3139.

## Références bibliographiques

- Kelly, R.C., Bolitho, M., Higgins, D., Lu, W., Ng, W., Jeffrey, P., Rabinowitz, J., Semmelhack, M., Hughson, F., Bassler, B., (2009). The *Vibrio cholerae* quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nature Chemical Biology* 5(12): 891-895.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M., Gibso, L., (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1-14.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M., Gibso, L., (2009). Screening for probiotics of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*, using a larval challenge bioassay. *Aquaculture* 296: 159-164.
- Kesarcodi-Watson, A., Miner, M., Nicolas, J., Robert, R., (2012). Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture* 344–349: 29–34.
- Khuntia, C., Das, B., Samantaray, B., Samal, S., Mishra, B., (2008). Characterization and pathogenicity studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Research* 39: 301-310.
- Kim, Y., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M., (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1173–1177.
- Kim, S., Lee, S., Kim, Y., Kim, C., Ryu, P., Choy, H., Chung, S., Rhee, J., (2003). Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Molecular Microbiology* 48:1647-1664.
- Kim, J., Park, K., Cho, K., Nam, S., Park, T., Bajpai, R., (2005). Aerobic nitrification- denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology* 96: 1897-1906.
- Kim, J., Kim, Y., Seo, Y., Park, S., (2007). Quorum sensing inhibitors from the red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Biotechnology Bioprocess Engineering* 12:308-311.
- Kim, K., Lee, S., Cho, Y., Bang, I., Kim, K-H., Kim, D., Nam, D., (2007). Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 1043-1059.
- Kleerebezem, M., Quadri, L., Kuipers, O., de Vos, W., (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 25: 895-904.
- Kodama, T., Rokuda, M., Park, K., Cantarelli, V., Matsuda, S., Iida, T., Honda, T., (2007). Identification and characterization of VopT, a novel ADP ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Cellular Microbiology* 9: 2598-2609.
- Kodama, T., Yamazaki, C., Park, K., Akeda, Y., Iida, T., Honda, T., (2010). Transcription of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes is regulated by a dual regulation system consisting of the ExsACDE regulatory cascade and H-NS. *FEMS Microbiology Letters* 311: 10-17.
- Komatsu, T., (1997). Long-term changes in the *Zostera* bed area in the Seto Inland Sea (Japan), especially along the coast of the Okayama Prefecture. *Oceanologica Acta* 20: 209-216.
- Krzystyniak, K., Tryphonas, H., Fournier, M., (1995). Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 103: 17-22.
- Kua, B., Ramly, R., Devakie, M., Groman, D., Berthe, C., (2011). Investigating a mortality in hatchery cultured tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus, 1758 in Malaysia, pp. 103-110. In Bondad-Reantaso, M., Jones, J., Corsin, F.,



## Références bibliographiques

- Aoki, T., (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 385 pp.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J., (2006<sub>a</sub>). Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 30:367-379
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, L., (2006<sub>b</sub>). Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology* 30(4): 367-79.
- Lake, R., Hudson, A., Cressey, P., (2003). Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Crown Research Institute. Institute of Environmental Science and Research Limited Christchurch Science Centre, P. O. Box 29 181, Christchurch, New Zealand, 2003.
- Laloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Gorgens, J., Gardiner, N., (2007). Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology* 103:1471-1479.
- Laloo, R., Moonsamy, G., Ramchuran, S., Gorgens, J., Gardiner, N., (2010). Competitive exclusion as a mode of action of a novel *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Letters in Applied Microbiology* 50:563-570.
- Lambert, C., Nicolas, J., Cilia, V., Corre, S., (1998). *Vibrio pectenicida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 48: 481-487.
- Lara-Flores, M., (2011). The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Research Journal of Microbiology* 2(12): 471-478.
- Lauer, M., de Oliveira, C., Inocencio, N., Bianchini, A., (2012). Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 156: 140-147.
- Lee, K., Liu, P., Chen, C., Huang, C., (2001). The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *Journal of Thermal Biology* 26: 585-587.
- Lee, K., Liu, P., Huang, C., (2003). *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusck abalone. *Microbes & Infection* 5: 481-485.
- Lee, M., Correa, J., (2004). Copper mine tailings disposal: consequences for the interstitial polychaete *Saccocirrus sonomacus* (Canalipalpata, Protodrilida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84: 603-606.
- Lee, M., Correa, J., (2005). The effects of copper mine tailings disposal on littoral meiofaunal assemblages in the Atacama region of northern Chile. *Marine Environmental Research* 59: 1-18.
- Lee, M., Correa, J., (2007). An assessment of the impact of copper mine tailings disposal on meiofaunal assemblages using microcosm bioassays. *Marine Environmental Research* 64: 1-20.
- Leighton L. D., (2000). The biology and culture of the California abalones. Dorrance Publishing Co, Pittsburgh, Pennsylvania. 216 pp.
- Lewis, A., (1990). The biological importance of copper. A literature review. Final report INCA project No. 223. [http://www.copper.org/environment/ica\\_review/pdf/e\\_r\\_90.pdf](http://www.copper.org/environment/ica_review/pdf/e_r_90.pdf).
- Leyton, Y., Riquelme, C., (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Mararina y Oceanografía* 43(3): 441-456.

## Références bibliographiques

- Li, T., Ding, M., Zhang, J., Xiang, J., Liu, R., (1998). Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal of Shellfish Research* 17(3): 707-711.
- Li, X., Rosemam, S., (2004). The chitinolytic cascade in vibrios is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 627-631.
- Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, A., Liu, Z., (2006). Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, 62: 565-572.
- Lilly, D., Stillwell, R., (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Lim, H., Kapareiko, D., Schott, E., Hanif, A., Wikfors, G., 2011. Isolation and Evaluation of New Probiotic Bacteria for use in Shellfish Hatcheries: I. Isolation and Screening for Bioactivity. *Journal of Shellfish Research* 30 (3): 609-2011.
- Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J., Nishibuchi, M., (1993). *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of Bacteriology* 175: 3844-3855.
- Lin, Y., Tanaka, S., Kong, H., (2006). Characterization of a newly isolated heterotrophic nitrifying bacterium. *Water Practice & Technology* 10: 22-166.
- Lindberg, D. R., (1992). Evolution, distribution and systematics of Haliotidae. In *Abalone of the world*. A. Shepherd, M. J. Tegner, and S. A. Guzmán del Prío, editors. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, pp. 318.
- Linkous, D.A., Oliver, J.D., (1999). Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*, 174: 207-214.
- Liston, L., (1990). Microbial hazards of sea food consumption. *Food Technology* 44: 56-62.
- Liu, P., Chen, Y., Huang, C., Lee, K., (2000). Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Letters in Applied Microbiology* 31:433-437.
- Liu, P., Chen, Y., Lee, K., (2001). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104: 71-77.
- Liu, K., Chiu, Ch., Shiu, Y., Cheng, W., Liu, Ch., (2010). Effects of the probiotics, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 837-844.
- Lo, C., Leung, P., Yip, S., To, T., Ng, Kam, K., (2008). Rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* by a sensitive and specific duplex PCR-hybridization probes assay using Lightcycler. *Journal of Applied Microbiology* 105 (2): 575-584.
- Lodeiros, C., Freitas, L., Fernández, E., Vélez, A., Bastardo, J., (1989). Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia de larvas de la viera *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. *Boletín instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad Oriente* 28: 165-169.
- Longeon, A., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Corre, S., Nicolas, J., Guyot, M., (2004). Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain x 453. *Marine Biotechnology* 6:633-641.
- Lorenzon, S., Francese, M., Ferrero, E., (2000). Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology* 39: 167-176.
- Lotze, H., Lenihan, H., Bourque, B., Bradbury, R., Cooke, M., Kay, M., Kidwell, S., Kirby, M., Peterson, C., Jackson, J., (2006). Depletion, Degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science* 312: 1806-1809.

## Références bibliographiques

- Lushchak, V., (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101:13-30.
- Luoma, S., (1984). Significance of metal tolerance in invertebrates. AAAS Annual Meeting, May 1984, New York. p. 137-147.
- Macey, B., Coyne, V., (2005). Improved growth rate disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 245: 249-261.
- Macey, B., Coyne, V., (2006). Colonization of the gastrointestinal tract of the farmed South African Abalone *Haliotis midae* by the probionts *Vibrio midae* SY9, *Cryptococcus* sp. SS1, and *Debaryomyces hansenii* AY1. *Marine Biotechnology* 8: 246-259.
- Maeda, M., Liao, I., (1992). Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva *Penaeus monodon*. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture* 25-29.
- Maeda, M., (1994). Biocontrol of the larvae rearing biotope in aquaculture. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture* 0:71-74.
- Maharajan, A., Vaseeharan, B., Rajalakshmi, S., Vijayakumaran, M., Kumarasamy, P., Chen, J., (2011). Effect of copper on morphology, weight and chromosomal aberrations in the spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Biological Trace Elements Research* 144 (1-3): 769-780.
- Maharajan, A., Rajalakshmi, S., Vijayakumaran, M., Kumarasamy, P., (2012). Sublethal effect of copper toxicity against histopathological changes in the spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Biological Trace Elements Research* 145: 201-210.
- Malham, S., Lactose, A., Gélébart, F., Cueff, A., Poulet, S.A., (2003). Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusk *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 295A: 136–144.
- Manyin, T., Rowe, C.L., (2009). Bioenergetic effects of aqueous copper and cadmium on the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 150: 65-71.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S., (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* 145: 283-291.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., Iida, T., (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361: 743-749.
- Makridis, P., Martins, S., Reis, J., Dinis, M., (2008). Use of probiotic bacteria in the rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture Research* 39:627-634.
- Marquina, D., Santos de la Sen, A., (2010). Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología). Serie Microbiología* 3 (5): 39-55.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D., Marin, M., (2001). Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Marine Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41:163-170.
- McCarter, L., (1998). OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 180:3166–3173.

## Références bibliographiques

- McCarter, L., (1999). The multiple indentities of *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology 1: 51-57.
- McIntyre, J., Baldwin, D., Meador, J., Scholz, N., (2008). Chemosensory deprivation in juvenile coho salmon exposed to dissolved copper under varying water chemistry conditions. Environmental Science & Technology 42:1352-1358.
- Metchnikoff, E., (1907). The Prolongation of Life. Optimistic Studies. William Heinemann, London.
- Merrifield, D., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Baker, R., Bogwald, J., et al., (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture. 302(1-2): 1-18.
- Milton, D., (2006). Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. International Journal of Medical Microbiology 296: 61-71.
- MINSAL., (2012). Ministerio de Salud, Departamento de Epidemiología, DIPLAS. Informe Final Brote de Gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* www.minsal.cl.
- Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., Yamai, S., (1969). In vitro hemolys characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. Journal of Bacteriology 100: 1147-1149.
- Moore, M., Depledge, M., Readman, J., Paul Leonard, D., (2004). An integrated biomarker based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 552 (1-2): 247-268.
- Morley, N., (2006). Parasitism as a source of potential distortion in studies on endocrine disrupting chemicals in molluscs. Marine Pollution Bulletin 52: 1330-1332.
- Morley, N.J., (2010). Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. Aquatic Toxicology 96: 27-36.
- Mori, I., Schroeder, J., (2004). Reactive Oxygen Species Activation of Plant  $Ca^{+2}$  Channels. A Signaling Mechanism in polar Growth, Hormone transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. Plant Physiology 135: 702-708.
- Mujeeb-Rahiman, K., Jesmi, Y., Thomas, A., Hatha, M., (2010). Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research 41: 20-34.
- Muñoz, P., Meseguer, J., Esteban, M.A., (2006). Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. Fish & Shellfish Immunology 20: 12-19.
- Nappi, A., Vass, E., Frey, F., Carton, Y., (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. European Journal of Cell Biology 68: 450-456.
- Nathan, C., Xie, Q., (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. Journal of Biological Chemistry 269: 13725-13728.
- Ng, W., Bassler, B., (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. Annual Review of Genetics 43: 197-222.
- Nhan, D., Cam, D., Wille, M., Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., (2010). Quorum quenching bacteria protect *Macrobrachium rosenbergii* larvae from *Vibrio harveyi* infection. Journal of Applied Microbiology 109:1007-1016.
- Nicas, T., Iglewski, B., (1985). The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Journal of Microbiology 66: 43-51.
- Nichols, D., (2003). Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. FEMS Microbiology Letters 219: 1-7.
- Nicolas, J., Basuyaux, O., Mazurie, J., Thebault, A., (2002). *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. Diseases of Aquatic Organisms 50(1): 35-43.



## Références bibliographiques

- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E., (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology* 15:443-52.
- Nishibuchi, M., Kaper, J., (1995). Thermostable Direct Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus* a Virulence Gene Acquired by a Marine Bacterium. *Infection & Immunity* 63 (6): 2093-2099.
- Nishibuchi, M., (2006). Molecular identification. The biology of vibrios, 4: 44-64. ASM Press, Washington DC.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T., Wakabayashi, T., (1998). *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supertexta*. *Fish Pathology* 33: 495-502.
- Noriea, N. F., Johnson, C., Griffitt, K., Grimes, D., (2010). Distribution of type III secretion systems in *Vibrio parahaemolyticus* from the northern Gulf of Mexico. *Journal of Applied Microbiology* 109: 953-962.
- Onifade, T., Hutchinson, R., Van Zile, K., Bodager, D., Baker, R., Blackmore, C., (2011). Toxin producing *Vibrio Cholerae* O75 outbreak. United States, March to April 2011. *Euro Surveillance* 16 (20): 19870.
- Ono, T., Park, K., Ueta, M., Iida, T., Honda, T., (2006). Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. *Infection & Immunity* 74: 1032-1042.
- Osorio, C., (2002). Moluscos marinos en Chile. Especies de importancia económica. Guía para su identificación. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 211 pp.
- Ottaviani, E., Paemen, L., Cadet, P., Stefano, G., (1993). Evidence for Nitric-Oxide Production and Utilization as a Bacteriocidal Agent by Invertebrate Immunocytes. *European Journal of Pharmacology-Environmental Toxicology & Pharmacology Section* 248: 319-324.
- Oubella, R., Auffret, M., (1995). Immuno-modulation in populations of mollusc bivalves from the Brest Roadsted. Acte de Rencontre Scientifique International. Communauté Urbaine, Brest (France), p 307-319.
- Pai, S., Anas, A., Jayaprakash, N., Priyaja, P., Sreelakshmi, B., Preetha, R., Philip, R., Mohandas, A., Bright, I., (2010). *Penaeus monodon* larvae can be protected from *Vibrio harveyi* infection by pre-emptive treatment of a rearing system with antagonistic or non-antagonistic bacterial probiotics. *Aquaculture Research* 41: 847-860.
- Paillard, C., Le Roux, F., Borrego, J., (2004<sub>a</sub>). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources* 17: 477-498.
- Paillard, C., Allam, B. and Oubella, R., (2004<sub>b</sub>). Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 249–262.
- Pandey, S., Ahmad, I., Parvez, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., (2001). Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology* 41: 345–352.
- Panigrahi, A., Viswanath, K., Satoh, S., (2011). Real-time quantification of the immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture Research* 42 (7): 906-917.
- Paris, E., 2005. Intoxicación Por *Vibrio Parahaemolyticus*. *Cuad Méd Soc (Chile)* 45: 43-47.
- Park, K., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M., Iida, T., Honda, T., (2004). Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology & Immunology* 48: 313-318.
- Parker, R., (1974). Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition & Health* 29: 4–8.
- Parvez, S., Sayeed, I., Pandey, S., Ahmad, A., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Ahmad, I., Raisuddin, S., (2003). Modulatory effect of copper on non-enzymatic antioxidants in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch.). *Biological Trace Element Research* 93: 237–248.

- Pass, D., Dybdahl, R., Mannion, M., (1987). Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in western Australia. *Aquaculture* 65: 149–169.
- Paul, W., (2003). *Fundamental immunology*. Lippincott, Williams and Wilkins, 5<sup>th</sup> edition, Philadelphia, 2003.
- Pestova, E., Havarstein, L., Morrison, D., (1996). Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Molecular Microbiology* 21(4): 853-62.
- Peters, L., König, G., Wright, A., Pukall, R., Stackebrandt, E., Eberl, L., Riedel, K., (2003). Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their influence in bacteria. *Applied & Environmental Microbiology* 69:3469-3475.
- Pinho, G., Pedroso, M., Rodrigues, S., Souza, S., Bianchini, A., (2007). Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquatic Toxicology* 84: 62-70.
- Piola, R., Johnston, E., (2006). Differential resistance to extended copper exposure in four introduced bryozoans. *Marine Ecology Progress Series* 311: 103-114.
- Pipe, R., (1990). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochemical Journal* 22:595-603.
- Pipe, R., Coles, J., (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 581-595.
- Pipe, R., Coles, J., Carissan, F., Ramanathan, K., (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 46: 43-54.
- Pizarro, C., (2003). Evaluación de una técnica de ensilado para el alga *Macrocystis pyrifera* y observación de su consumo por parte del abalón rojo (*Haliotis rufescens*). Tesis de grado, Universidad Católica de Temuco. 50p.
- Planas, M., Pérez-Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Fiksdal, I., Bergh, O., Pintado, J., (2006). Probiotic effect *in vivo* of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 255:323-333.
- Plaxton, W., (2004). Principle of metabolic control. In *Functional Metabolisms: Regulation and Adaptation* (Eds. Storey, K. B.), pp. 594. N.Y.: Wiley-Liss.
- Porsby, C., Nielsen, K., Gram, L., (2008). *Phaeobacter* and *Ruegeria* Species of the *Roseobacter* Clade Colonize Separate Niches in a Danish Turbot (*Scophthalmus maximus*)-Rearing Farm and Antagonize *Vibrio anguillarum* under Different Growth Conditions. *Applied & Environmental Microbiology* 74 (23): 7356-7364.
- Prado, S., Romalde, J., Montes, J., Barja, J., (2005). Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Diseases of Aquatic Organisms* 67: 209-215.
- Prado, S., (2006). Microbiota asociada a criaderos de moluscos: patogénesis y probiosis. PhD. Thesis. Universidad de Santiago de Compostela, España (en Español).
- Prado, S., Romalde, J., Barja, J., (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology* 145: 187–197.
- Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R., Donelli, G., (2005<sub>a</sub>). Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Estuarine Environments. *Ocean & Health: Pathogens in the Marine Environments* 9:217-252.
- Rainbow, P., (1990). Heavy Metal levels in Marine Invertebrates. In: Furness, R.W. & Rainbow, P.S. (Eds.), *Heavy Metals In The Marine Environment*, CRC Press, Florida, U.S.A. pp. 67-79.
- Ramalingam, K., Shyamala, D., (2006). Influence of *Vibrio parahaemolyticus* MTCC 451 on the levels on ascorbic and histamine in *Penaeus monodon* (Fabricius). *Journal of Environmental Biology* 27 (1): 67-70.

## Références bibliographiques

- Ramirez, M., Massolo, S., Frache, R., Correa, J., (2005). Metal speciation and environmental impact on sandy beaches due to El Salvador copper mine, Chile. *Marine Pollution Bulletin* 50: 62-72.
- Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W., Ekmann, S., Larsen, J., Johansen, C., Riedel, K., Eberl, L., Givskov, M., Gram, L., (2004). An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Systematic & Applied Microbiology* 27:350-359.
- Ratledge, C., (2007). Iron metabolism and infection. *Food & Nutrition Bulletin* 28: 515–523.
- Rattanachua, P., Kantachote, D., Tantirungkij, M., Nitoda, T., Kanzaki, H., (2010). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by extracellular compounds from a proteolytic bacterium *Pseudomonas* sp W3. *Electronic Journal of Biotechnology* 13.
- Raven, J., Evans, M., Korb, R., (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sup>2</sup>-evolving organism. *Photosynthesis Research* 60: 111-149.
- Ravi, A., Musthafa, K., Jegathambal, G., Kathiresan, K., Pandian, S., (2007). Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology* 45:219-223.
- Ray, B., (1996). *Fundamental food Microbiology*. CRS press. Boca Raton, Florida.
- Reitan, K., Rainuzzo, J., Øie, O., Olsen, Y., (1993). Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Aquaculture* 118: 257-275.
- Reitan, K., Rainuzzo, J., Øie, O., Olsen, Y., (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155: 207-221.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191: 271-288.
- Rhode, C., (2010). Development of gene-linked molecular markers in South African abalone (*Haliotis midae*) using an in silico mining approach. M.Sc. (Genetics) Thesis. Stellenbosch: Stellenbosch University.
- Riedel, G., (2008). Copper. *Ecotoxicology* 778-783.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M., Ishida, Y., (1996). Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research* 15: 369-374.
- Riquelme, C., Araya, N., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M., Candia, M., (1997). Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 54(1): 17-26.
- Riquelme, C., Araya, R., Escribano, R., (2000). Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181: 25-36.
- Riquelme, C., Jorquera, M., Rojas, A., Avendaño, R., Reyes, N., (2001). Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192: 111-119.
- Riveros, A., Zuñiga, M., Hernández, A., Camaño, A., (2002). Cellular biomarkers in native and transplanted populations of the mussel *Perumytilus purpuratus* in the intertidal zones of San Jorge Bay, Antofagasta, Chile. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology* 42: 303-312.
- Riveros, A., Zuñiga, M., Larraín, A., (2003). Copper metallothionein-like proteins as exposure biomarker in native and transplanted intertidal populations of the mussel *Perumytilus purpuratus* from San Jorge Bay, Antofagasta, Chile. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 70: 233-241.
- Roger, S., Iglwesi, B., (2003). *P. aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology* 6: 56-60.

- Romero, M., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M., Otero, A., (2010). Acyl homoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) division. FEMS Microbiology Letters 304:131-139.
- Roodt-Wilding, R., (2007). Abalone ranching: a review on genetic considerations. Aquaculture Research 38: 1229-1241.
- Roque, A., Mazari, A., Gómez-Gil, B., (2000). Oral challenge of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* through bioencapsulation of *Vibrio parahaemolyticus* en *Artemia franciscana*. Ciencias Marinas 26: 65-77.
- Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M., Britigan, B., (1995). Free radicals and phagocytic cells. FASEB J. 9: 200-209.
- Rowe-Magnus, D., Zouine, M., Mazel, D., (2006). The adaptive genetic arsenal of pathogenic vibrio species: the role of integrons. The biology of vibrios 8: 95-111. ASM Press, Washington DC.
- Rubino, J., Franz, K., (2012). Coordination chemistry of cooper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. Journal of Inorganic Biochemistry 107: 129-143.
- Ruiz-Ponte, C., Samain, J., Sánchez, J., Nicolas, J., (1999). The Benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. Marine Biotechnology 1:52-59.
- Ruwandeeepika, H., Jayaweera, T., Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., Defoirdt, T., (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. Reviews in Aquaculture 4: 59–74.
- Sabatini, S., Juárez, A., Eppis, M., Bianchi, L., Luquet, C., Ríos de Molina, M., (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two Green microalgae exposed to copper. Ecotoxicology & Environmental Safety 72: 1200-1206.
- Salamanca, M.A., Camano, A., Jara, B., (2000). Distribucion de Cu, Pb y Zn en aguas costeras de bahia San Jorge en el Norte de Chile. Gayana 64 (2): 195-204.
- Salamanca, M., Jara, B., Rodríguez, T., (2004). Niveles de Cu, Pb y Zn en aguas y *Perumytilus purpuratus* en Bahía San Jorge, norte de Chile. Gayana 68: 53-62.
- Salviati, L., Hernandez-Rosa, E., Walker, W., Sacconi, S., DiMauro, S., Schon, E., Davidson, M., (2002). Copper supplementation restores cytochrome c oxidase activity in cultured cells from patients with SCO<sub>2</sub> mutations. Biochemical Journal 363: 321-327.
- Salyers, A., White, D., (2002). Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press. Washington D. C.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J., Aït-Aïssa, S., (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. Environmental Toxicology & Pharmacology 19: 177-183.
- Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H., (1995). Enhancement of chemiluminescent responses of phagocytic cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by injection of growth hormone. Fish & Shellfish Immunology 5:375–379.
- Sakai, K., Nakamura, K., Wakayama, M., Moriguchi, M., (1997). Change in nitrite conversion direction from oxidation to reduction in heterotrophic bacteria depending on the aeration conditions. Journal of Fermentation & Bioengineering 86: 47-52.
- Sandlund, N., Torkildsen, L., Maqnesen, T., Mortesen, S., Bergh, O., (2006). Immunohistochemistry of great scallop *Pecten maximus* larvae experimentally challenged with pathogenic bacteria. Diseases of Aquatic Organisms 69: 163-173.
- Sarkar, A., Ray, D., Amulya, N., Subhdeep, S., (2006). Molecular Biomarker: Their significance and application in marine pollution monitoring. Ecotoxicology 15 (4): 333-340.



## Références bibliographiques

- Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Sendcal, L., Goudreau, P., Fournier, M., (2002). Phagocytosis activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic toxicology* 58: 189-200.
- Sawabe, T., Setogushi, N., Inoue, S., Tanaka, R., Ootsubo, M., Yoshimizu, M., Ezura, Y., (2003). Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginates: a possible role for establishment of abalone - *V. haliotocoli* association. *Aquaculture* 219: 671-679.
- Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y., Miura, Y., (2007). Mass mortalities of Japanese abalone *Haliotis diversicolor supertexta* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes & Environment* 22(3): 300-308.
- Sawasdee, B., Köler, H., Triebskorn, R., (2011). Histopathological effects of copper and lithium in ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia). *Chemosphere* 85: 1033-1039.
- Sbihi, K., Cherifi, O., El gharmali, A., Oudra, B., Aziz, F., (2012). Accumulation and toxicological effects of cadmium, copper and zinc on the growth and photosynthesis of the freshwater diatom *Planothidium lanceolatum* (Brébisson) Lange-Bertalot: A laboratory study. *Journal of Material & Environmental Sciences* 3 (3): 497-506
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M., Bassler, B., (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology* 41:463-476.
- Schuster, M., Greenberg, E., (2006). A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* 296: 73-81.
- Silva-Aciaries, F., Mejías, C., Carvajal, P., Riquelme, C., (2011<sub>a</sub>). Use of macroalgae supplemented with probiotics in the *Haliotis rufescens* culture in the northern Chile. *Aquaculture Research* 42: 953-961.
- Silva-Aciaries, F., Zapata, M., Tournois, J., Moraga, D., Riquelme, C., (2011<sub>b</sub>). Identification of genes expressed in juvenile *Haliotis rufescens* in response to different copper concentrations in the north of Chile under controlled conditions. *Marine Pollution Bulletin* 62: 2671-2680.
- Simidu, U., Tsukamoto, K., (1985). Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family *Vibrionaceae*. *Applied & Environmental Microbiology* 50: 781-790.
- Skindersoe, M., Ettinger-Epstein, P., Rasmussen, T., Bjarnsholt, T., de Nys, R., Givskov, M., (2008). Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Marine Biotechnology* 10:56-63.
- Snieszko, S., (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6: 197-208.
- Sokolova, I., (2009). Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal* 6: 49-58.
- Soto, P., Gaete, H., Hidalgo, M., (2011). Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, Chlorophyll-a, and growth rate in the freshwater Green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc. *Latin America Journal of Aquatic Research* 39 (2): 280-285.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E., Pipper, C., Martinussen, Y., Slierendrecht, W., Gram, L., (2001). The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 3:755-765.
- Stauber, J., Andrade, S., Ramirez, M., Adams, M., Correa, J., (2005). Copper bioavailability in a coastal environment of northern Chile: comparison of bioassay and analytical speciation approaches. *Marine Pollution Bulletin* 50: 1363-1372.
- Steinert, S., Pickwell, G., (1988). Expression of heat shock protein and metallothionein in mussels exposed to heat stress and metal ion challenge. *Marine Environmental Research* 24: 211-214.

## Références bibliographiques

- Sudheesh, P., Xu, H., (2001). Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196: 37-46.
- Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., Deguchi, Y., (1997). *Vibrio* sp. Strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied & Environmental Microbiology* 63:4986-4989.
- Sugiyama, T., Iida, T., Izutsu, K., Park, K., Honda, T., (2008). Precise region and the character of the pathogenicity island in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Journal of Bacteriology* 190: 1835-1837.
- Sutton, D., Garrik, R., (1993). Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 16: 47-53.
- Talpur, A., Memon, A., Khan, M., Ikhwanuddin, M., Danish, M., Abol-Munafi, A., (2011). Supplementation of Indigenous *Lactobacillus* Bacteria in Live Prey and as Water Additive to Larviculture of *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758). *Advance Journal of Food Science & Technology* 3(5): 390-398.
- Tan, L., Yin, W., Chan, K., 2012. Silencing Quorum Sensing through Extracts of *Melicope lunu-ankenda*. *Sensors* 12: 4339-4351.
- Taub, F., (2004). Fish 430 lectures (Biological Impacts of Pollutants on Aquatic Organisms), University of Washington College of Ocean & Fisheries Sciences. Seattle, WA.
- Tett, P., Gilpin, L., Svendsen, H., Erlandsson, C.P., Larsson, U., Kratzer, S., Fouilland, E., Janzen, C., Lee, J.Y., Grenz, C., Newton, A., Ferreira, J., Fernandes, T., Scory, S., (2003). Eutrophication and some European waters of restricted exchange. *Continental Shelf Research* 23: 1635-1671.
- Ten Doeschate, K., Coyne, V., (2008). Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* Through probiotic treatment. *Aquaculture*. 284, 174-179.
- Terahara, K., Takahashi, K., (2008). Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Current Pharmaceutical Design* 14: 131-137.
- Thiagarajan, R., Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., (2006). Immunomodulation in the Marine green Mussel *Perna viridis* exposed to Sub-Lethal Concentrations of Cu and Hg. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology* 51: 392-399.
- Thompson, F., Iida, T., Swings, J., (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* 68(3):403-431.
- Thompson, F., Swings, J., (2006). Taxonomy of Vibrios. In Thompson, F., Austin, B., Swings, J., (eds). *The Biology of Vibrio*. Chapter 3 ASM Press Washington D.C. 29-43 pp.
- Thompson, J., Polz, M., (2006). Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*, 13: 190-203. ASM Press, Washington DC.
- Thompson, J., Gregory, S., Plummer, S., Shields, R., Rowley, A., (2010). An in vitro and in vivo assessment of the potential of *Vibrio* spp. as probiotics for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Microbiology* 109 (4): 1177-1187.
- Tinh, N., Linh, N., Wood, T., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P., (2007). Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of Applied Microbiology* 103:194-203.
- Tinh, N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P., (2008). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology* 10:1-12.

- Tiscar, P., Mosca, F., (2004). Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Veterinary Research Communications* 28: 57-62.
- Tseng, D., Ho, P., Huang, S., Cheng, S., Shiu, Y., Chiu, Ch., Liu, Ch., (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotics, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & Shellfish Immunology* 26: 339-344.
- Travers, M., Da Silva, P., Le Goïc, N., Marie, D., Donvala, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., (2008<sub>a</sub>). Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 24 (4): 400-411.
- Travers, M., Barbou, A., Le Goïc, N., Huchette, S., Paillard, C., Koken, M., (2008<sub>b</sub>). Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiology Letters* 289: 34–40.
- Travers, M., Basuyaux, O., Nicolas, J., Friedman, C., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., (2008<sub>c</sub>). Temperature dependant vibriosis of the European abalone, *Haliotis tuberculata*. *Journal of Shellfish Research* 27: 1058.
- Travers, M., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., (2008<sub>d</sub>). Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 800–808.
- Travers, M., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J., Koken, M., Paillard, C., (2009). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology* 15: 1365-1376.
- Travers, M., Le Bouffant, R., Friedman, C., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., (2009). Pathogenic *Vibrio harveyi*, in Contrast to Non-Pathogenic Strains, Intervenes With the p38 MAPK Pathway to Avoid an Abalone Haemocyte Immune Response. *Journal of Cellular Biochemistry* 106:152–160.
- Travers, M., Meistertzheim, A., Cardinaud, M., Friedman, C., Huchette, S., Moraga, D., Paillard, C., (2010). Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*, during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *Journal of Invertebrate Pathology* 105: 289–297.
- Tripathi, B., Mehta Anshu Amar, S., Gaur, J., (2006). Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. *Chemosphere* 62: 538-544.
- Troell, M., Roberson-Andersson, D., Anderson, R. J., Bolton, J. J., Maneveldt, G., Halling, C., Probyn, T., (2006). Abalone farming in South Africa: an overview with perspectives on kelp resources, abalone feed, potential for on-farm seaweed production and socio-economic importance. *Aquaculture* 257: 266-281.
- Tubiash, H., Otto, S., (1986). Bacterial problems in oysters. A review. In: Vivares, C., Bonami, J., Jasper, E., (eds). *Pathology in Marine Aquaculture*. Bredene, Belgium, European Aquaculture Society, Spec. Publ 9: 233-242.
- Urakawa, H., Rivera, I., (2006). Aquatic environment. The biology of vibrios, 12: 175-189. ASM Press, Washington DC.
- Urdaci, M., Stal, L., Marchand, M., (1988). Occurrence of nitrogen fixation among *Vibrio* spp. *Archives of Microbiology* 224-229.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 64(2): 178-189.
- Valdés, J., Román, D., Rivera, L., Ávila, J., Cortés, P., (2011). Metal contents in coastal waters of San Jorge Bay, Antofagasta, northern Chile: a base line for establishing seawater quality guidelines. *Environmental Monitoring & Assessment* 183: 231–242.

- Vanbelle, M., Teller, E., Focant, M., (1990). Probiotics in animal nutrition: a review. *Archiv für Tierernaehrung* 40(7): 543–567.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N., (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Vandeputte, O., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., Jaziri, M., Baucher, M., (2010). Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Applied & Environmental Microbiology* 76: 243-253.
- Vasta, G., Ahmed, H., (2008). *Animal lectins: A functional view*. CRC Press, Boca Raton FL, 2008.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* 64 (4):655-671.
- Viana, A., (2002). Avances en la nutrición, fisiología digestiva y metabolismo del abulon. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia- Salazar, M., Gaxiola-Cortes, M. G., Simoes, N (Eds). *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memórias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, quintana Roo, Mexico.
- Viant, M., Walton, J., Tenbrook, P., Tjeerdema, R., (2002). Sublethal action of copper in abalone (*Haliotis rufescens*) as characterized by in vivo <sup>31</sup>P NMR. *Aquatic toxicology* 57: 139-151.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Orunesu, M., Mazzucotelli, A., Bouqueneau, J., (1988). Biochemical characterization of a copper-thionein involved in Cu accumulation in the lysosomes of the digestive gland of mussel exposed to the metal. *Marine Environmental Research* 24: 163.166.
- Viarengo, A., Nicotera, P., (1991). Possible role of Ca<sup>2+</sup> in heavy metal cytotoxicity. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 100: 81-84.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Burlando, B., Canesi, L., Orunesu, M., (1996). In vivo effects of copper on the calcium homeostasis mechanisms of mussels gill cells plasma membrane. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 113: 421-425.
- Vine, N., Leukes, W., Kaiser, H., (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30:404-427.
- Vosloo, D., Sara, J., Vosloo, A., (2012). Acute responses of brown mussel (*Perna perna*) exposed to sub-lethal copper levels: Integration of physiological and cellular responses. *Aquatic Toxicology* 106-107: 1-8.
- Wagner-Dobler, I., Thiel, V., Eberl, L., Allgaier, M., Bodor, A., Meyer, S., Ebner, S., Hennig, A., Pukall, R., Schulz, S., (2005). Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chembiochem* 6:2195-2206
- Waldor, M., Mekalanos, J., (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-1914.
- Wang, Y., Xu, Z., Xia, M., (2005). The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries Science* 71: 1036-1041.
- Wang, J., Chuang, C., Wang, W., (2005). Metal and oxygen uptake in the green mussel *Perna viridis* under different metabolic conditions. *Environmental Toxicology & Chemistry* 24: 2657–2664.
- Wang, L., Zheng, B., (2008). Toxic effects of fluoranthene and copper on marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Environmental Sciences* 20: 1363-1372.
- Wang, Y-B., Li, J-R., Lin, J., (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture* 281:1-4.



- Wang, K., Ren, H., Xu, D., Cai, L., Ming, Y., (2008<sub>a</sub>). Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* 32: 1326-1347.
- Wang, G., Zhang, K., Zhang, Z., Zou, Z., Jia, X., Wang, S., Lin, P., Wang, Y., (2008<sub>b</sub>). Molecular cloning and responsive expression of macrophage expressed gene from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Fish & Shellfish Immunology* 24: 346-359.
- Wang, W., (2012). Dietary toxicity of metals in aquatic animals: Recent studies and perspectives (Review). *Chinese Science Bulletin* doi: 10.1007/s11434-012-5413-7.
- Watnick ,P., Lauriano, C., Klose, K., Croal, L., Kolter, R., (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Molecular Microbiology* 39: 223-235.
- Weintraub, A., Widmalm, G., Jansson, P.E., Jansson, M., Hultenby, K., Albert, M.J., (1994). *Vibrio cholera* O139 Bengal possesses a capsular polysaccharide which may confer increased virulence. *Microbial Pathogenesis* 16: 235-41.
- Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S., Conway, P., (1991). Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied & Environmental Microbiology* 57:2223-2228.
- White, S., Rainbow, R., (1985). On the metabolic requeriments for copper and zinc in mollusk and crustacean. *Marine Environmental Research* 16: 215-229.
- Wit, P., Palumbi, S., (2012). Transcriptome-wide polymorphisms of red abalone (*Haliotis rufescens*) reveal patterns of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology* DOI: 10.1111/mec.1208.
- Won, E., Rhee, J., Kim, R., Ra, K., Kim, K., Shin, K., Lee, J., (2012). Susceptibility to oxidative stress and modulated expression of antioxidant genes in the copper-exposed polychaete *Perinereis nuntia*. *Comparative Biochemistry & Physiology C* 155: 344-351.
- Wyckoff, E., Mey, A., Payne, S., (2007). Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biometals* 20: 405–416.
- Xian, J., Wang, A., Ye, C., Chen, X., Wang, W., (2010). Phagocytic activity, respiratory burst, cytoplasmic free-Ca<sup>2+</sup> concentration and apoptotic cell ratio of haemocytes from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* under acute copper stress. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part C* 152: 182-188.
- Yeretssian, G., Labbe, K., Saleh, M., (2008). Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine* 43: 380-390.
- Yue, X., Liu, B., Xiang, J., Jia, J., (2010). Identification and characterization of the pathogenic effect of a *Vibrio parahaemolyticus*-related bacterium isolated from clam *Meretrix meretrix* with mass mortality. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 109-115.
- Zapata, M., Tanguy, A., David, E., Moraga, D., Riquelme, C., (2009). Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. *Gene* 442: 37–46.
- Zauke, G., Clason, B., Savinow, V., Savinova, T., (2003). Heavy metals of inshore benthic invertebrates from the Barents Sea. *The Science of the Total Environment* 306(1-3): 99-110.
- Zhang, D., Rajanna, C., Sun, W., Karaolis, D., (2003). Analysis of the *Vibrio* pathogenicity island-encoded Mop protein suggests a pleiotropic role in the virulence of epidemic *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters* 225: 311–318.
- Zhang, Y., Song, J., Yuan, H., Xu, Y., He, Z., Duan, L., (2010). Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper. *Environmental Toxicology & Pharmacology* 30: 19–25.

## Références bibliographiques

- Zhang, L., Liu, X., You, L., Zhou, D., Wu, H., Li, L., Zhao, J., Feng, J., Yu, J., (2012). Metabolic responses in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to copper using NMR-based metabolomics. *Marine Environmental Research* 72: 33-39.
- Zhou, X., Shah, D., Konkel, M., Call, D., (2008). Type III secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus* are positively regulated by ExsA and negatively regulated by ExsD. *Molecular Microbiology* 69: 747-764.
- Zhou, J., Cai, Z., Zhu, X., Li, L., Gao, Y., (2010). Innate immune parameters and haemolymph protein expression profile to evaluate the immunotoxicity of tributyltin on abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Developmental & Comparative Immunology* 34: 1059–1067.
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrillon, M., Diaz, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M., Morínigo, M., (2003). *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases* 26: 103-108.
- Zippay, M., Hofmann, G., (2010). Effect of pH on Gene Expression and Thermal Tolerance of Early Life History Stages of Red Abalone (*Haliotis rufescens*). *Journal of Shellfish Research* 29: 429-439.

# **Annexe**

## Annexe: Gènes révélés dans les banques soustractives de juvéniles sevrés d'*Haliotis rufescens* exposés au cuivre (Article 2)

**Table S1. Up-regulated genes identified after 12 hours of 2.5  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{+2}$  exposure**

Homologue (protein)	Homolog species	BLASTX value	GenBank accession n°
Cellular communication			
Putative senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>	9e-32	HO188884
Receptor of Activated Kinase C 1	<i>Mya arenaria</i>	3e-34	HO188885
GNB2L1 protein	<i>Bos taurus</i>	3e-35	HO188886
Development, differentiation			
Developmentally-regulated vdg3	<i>Haliotis asinina</i>	6e-22	HO188887
General Metabolism			
Alginase	<i>Haliotis discus discus</i>	1e-59	HO188888
PC1	<i>Haliotis rubra</i>	4e-13	HO188889
CTRL_HALRU Chymotrypsin-like serine proteinase precursor	<i>Haliotis rufescens</i>	7e-15	HO188890
Respiratory chain, respiration			
Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Haliotis rubra</i>	8e-33	HO188891
Cytochrome c oxidase subunit II	<i>Haliotis rubra</i>	2e-54	HO188892
Cytochrome c oxidase subunit III	<i>Haliotis rubra</i>	9-39	HO188893
NADH dehydrogenase subunit 4	<i>Haliotis rubra</i>	1e-26	HO188894
Stress protein			
Ferritin	<i>Haliotis discus hannai</i>	6e-11	HO188895
Ribosomal protein			
Ribosomal protein rpl26	<i>Arenicola marina</i>	5e-32	HO188896
	<i>Branchiostoma belcheri</i>		
Ribosomal protein L10a	<i>tsingtaunese</i>	1e-29	HO188897
Ribosomal protein L3	<i>Argopecten irradians</i>	5e-45	HO188898
Unknown function			
Hypothetical protein LOC753819	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	6e-09	HO188899
Hypothetical protein Bm1_17870	<i>Brugia malayi</i>	4e-15	HO188900
Hypothetical protein CLONEX_01831	<i>Clostridium nexile DSM 1787</i>	5e-24	HO188901
Predicted protein	<i>Nematostella vectensis</i>	2e-05	HO188902
Similar to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 preproprotein	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	1e-10	HO188903
Unknown genes (23 sequences)			HO188904 to HO188926



Table S2. Up-regulated genes identified after 7 days of 2.5 µg/l Cu<sup>2+</sup> exposure

Homologue (protein)	Homolog species	BLASTX value	GenBank accession n°
Amino acid metabolism			
Acireductone dioxygenase 1	<i>Xenopus laevis</i>	7e-26	HO188927
Cellular communication			
Senescence-associated protein, putative	<i>Brugia malayi</i>	9e-10	HO188928
Cytoskeleton			
Myosin heavy chain	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1e-21	HO188929
Beta-actin	<i>Euprymna scolopes</i>	7e-26	HO188930
Actin	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	1e-77	HO188931
Development, differentiation			
GNB2L1 protein	<i>Bos taurus</i>	3e-36	HO188932
Vm2	<i>Haliotis asinina</i>	2e-69	HO188933
Developmentally-regulated vdg3	<i>Haliotis asinina</i>	3e-07	HO188934
General Metabolisms			
Endo-beta-1,4-glucanase	<i>Ampullaria crossean</i>	7e-10	HO188935
CTRL_HALRU Chymotrypsin-like serine proteinase precursor	<i>Haliotis rufescens</i>	7e-15	HO188936
Alginase	<i>Haliotis discus discus</i>	2e-51	HO188937
Immunity			
Beta-glucan recognition protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	7e-52	HO188938
Protein regulation			
Ubiquitin	<i>Eriocheir sinensis</i>	1e-17	HO188939
Small androgen receptor-interacting protein	<i>Haliotis rufescens</i>	4e-36	HO188940
ependymin related protein-1 precursor	<i>Branchiostoma belcheri</i>	7e-20	HO188941
Respiratory chain, respiration			
Cytochrome b	<i>Haliotis discus hannai</i>	2e-37	HO188942
Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Haliotis tuberculata</i>	1e-21	HO188943
Cytochrome c oxidase subunit II	<i>Haliotis discus hannai</i>	5e-58	HO188944
Ribosomal protein			
Similar to ribosomal protein L22e	<i>Nasonia vitripennis</i>	1e-24	HO188945
60S ribosomal protein L13A	<i>Mytilus edulis</i>	1e-35	HO188946
Ribosomal protein S26	<i>Equus caballus</i>	2e-09	HO188947
Ribosomal protein rps3a	<i>Eurythoe complanata</i>	9e-23	HO188948
Ribosomal protein L31	<i>Crassostrea gigas</i>	4e-18	HO188949
Unknown function			
Hypothetical protein RUMGNA_02960	<i>Ruminococcus gnavus ATCC 29149</i>	1e-05	HO188950
Unknown	<i>Schistosoma japonicum</i>	9e-21	HO188951
Unknown genes (23 sequences)			HO188952 to HO188974

Table S3. Down-regulated genes identified after 12 hours of 2.5 µg/l Cu<sup>+2</sup> exposure

Homologue (protein)	Homolog species	BLASTX value	GenBank accession n°
Cytoskeleton			
Myosin regulatory light chain	<i>Placopecten agellanicus</i>	9e-37	HO188975
Myosin heavy chain	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1e-05	HO188976
Beta-actin	<i>Euprymna scolopes</i>	3e-25	HO188977
Cell wall-associated hydrolase	<i>Fusobacterium sp</i>	2e-05	HO188978
Protein regulation			
Similar to membrane-type serine protease 1	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	1e-06	HO188979
Respiratory chain, respiration			
Cytochrome b	<i>Haliotis rubra</i>	6e-44	HO188980
Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Haliotis discus hannai</i>	7e-47	HO188981
Cytochrome c oxidase subunit III	<i>Haliotis rubra</i>	6e-49	HO188982
NADH dehydrogenase subunit 5	<i>Haliotis rubra</i>	8e-26	HO188983
Ribosomal proteins			
Ribosomal protein S15A	<i>Lysiphlebus testaceipes</i>	3e-27	HO188984
Unknown function			
Hypothetical protein			
Hypothetical protein RUMOB_04125	<i>Ruminococcus obeum ATCC 29174</i>	9e-05	HO188985
Hypothetical protein RUM_LAC_00366	<i>Ruminococcus lactaris ATCC 29176</i>	1e-05	HO188986
Hypothetical protein	<i>Thermobia domestica</i>	6e-05	HO188987
Unknown genes (14 sequences)			HO188988 to HO189002

Table S4. Down-regulated genes identified after 7 jours of 2.5 µg/l Cu<sup>+2</sup> exposure

Homologue (protein)	Homolog species	BLASTX value	GenBank accession n°
Cytoskeleton			
Matrilin	<i>Biomphalaria glabrata</i>	6e-04	HO189003
PREDICTED: similar to SDA1 domain containing 1	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	8e-11	HO189004
Nucleic acids regulation			
Myc homolog	<i>Crassostrea virginica</i>	3e-04	HO189005
Protein regulation			
Translationally-controlled tumor protein	<i>Branchiostoma belcheri</i>	8e-16	HO189006
Polyubiquitin GmUb1	<i>Galleria mellonella</i>	5e-10	HO189007
Respiratory chain			
Cytochrome c oxidase subunit III	<i>Haliotis rubra</i>	2e-73	HO189008
Xenobiotique detoxification			
Cytochrome P450 family 4 variant 2	<i>Cyphoma gibbosum</i>	3e-38	HO189009
Ribosomal protein			
Ribosomal protein S10	<i>Crassostrea gigas</i>	3e-31	HO189010
Ribosomal protein S30	<i>Crassostrea gigas</i>	6e-17	HO189011
Ribosomal protein L	<i>Argopecten irradians</i>	1e-68	HO189012
Ribosomal protein L21	<i>Argopecten irradians</i>	4e-10	HO189013
Unknown function			
Hypothetical protein RUMGNA_02960	<i>Ruminococcus gnavus ATCC 29149</i>	1e-05	HO189014
Conserved hypothetical protein	<i>Streptomyces ghanaensis ATCC 14672</i>	2e-09	HO189015
Unknown genes (37 sequences)			HO189016 to HO189052

Table S5. Up-regulated genes identified after 12 hours of 10 µg/l Cu<sup>2+</sup> exposure

Homologue (protein)	Homolog species	BLASTX value	GenBank accession n°
Cellular communication Putative senescence-associated protein	<i>Trichosanthes dioica</i>	1e-07	HO189053
General Metabolisms Alginase	<i>Haliotis discus discus</i>	6e-52	HO189054
Immunity Beta-glucan recognition protein 1	<i>Crassostrea gigas</i>	8e-30	HO189055
Protein regulation Elongation factor 1 alpha	<i>Haliotis rufescens</i>	2e-79	HO189056
TPA: putative cystatin	<i>Zea mays</i>	1e-07	HO189057
Ependymin related protein-1 precursor	<i>Haliotis discus discus</i>	2e-22	HO189058
Respiratory chain Cytochrome b	<i>Haliotis tuberculata</i>	2e-35	HO189059
Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Haliotis discus hannai</i>	1e-64	HO189060
Cytochrome c oxidase subunit III	<i>Haliotis rubra</i>	6e-78	HO189061
NADH dehydrogenase subunit 3	<i>Haliotis discus hannai</i>	6e-06	HO189062
Stress protein Laminin	<i>Haliotis discus hannai</i>	1e-06	HO189063
Unknown function Hypothetical protein	<i>Pediculus humanus corporis</i>	3e-08	HO189064
Unknown genes (12 sequences)			HO189065 to HO189075 and HO189237



Table S6. Up-regulated genes identified after 7 jours of 10 µg/l Cu<sup>+2</sup> exposure

Homologue (protein)	Homolog species	BLASTX value	GenBank accession n°
Cellular communication			
Putative senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>	9e-26	HO189076
Low-density lipoprotein receptor 1 (LpR1)	<i>Pediculus humanus corporis</i>	4e-05	HO189077
Cytoskeleton			
Actin	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	9e-50	HO189078
Development, differentiation			
Developmentally-regulated vdg3	<i>Haliotis asinina</i>	7e-08	HO189079
General Metabolisms			
Alginase	<i>Haliotis discus discus</i>	7e-76	HO189080
Aldose 1-epimerase	<i>Petrogala mobilis SJ95</i>	6e-06	HO189081
Protein regulation			
Sec24 related gene family, member C (S. cerevisiae)	<i>Mus musculus</i>	1e-08	HO189082
Small androgen receptor-interacting protein	<i>Haliotis rufescens</i>	6e-22	HO189083
Respiratory chain			
Cytochrome b	<i>Haliotis discus hannai</i>	5e-15	HO189084
Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Haliotis discus hannai</i>	3e-60	HO189085
Cytochrome c oxidase subunit II	<i>Haliotis discus hannai</i>	8e-51	HO189086
Cytochrome c oxidase subunit III	<i>Haliotis rubra</i>	4e-42	HO189087
NADH dehydrogenase subunit 4	<i>Haliotis discus hannai</i>	7e-58	HO189088
ATP synthase subunit 6	<i>Haliotis tuberculata</i>	1e-20	HO189089
Ribosomal protein			
60S ribosomal protein L15	<i>Haliotis diversicolor</i>	3e-31	HO189090
Unknown function			
Predicted protein 3	<i>Haliotis diversicolor</i>	2e-22	HO189091
Hypothetical protein LOC764436	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	1e-06	HO189092
	<i>Talaromyces stipitatus ATCC 10500</i>	6e-11	HO189093
Hypothetical protein	<i>Ixodes scapularis</i>	1e-08	HO189094
Hypothetical protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5e-11	HO189095
Hypothetical protein	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>	6e-51	HO189096
Hypothetical protein	<i>Branchiostoma floridae</i>	2e-07	HO189097
	<i>Physcomitrella patens subsp.</i>		
Hypothetical protein	<i>Patens</i>	9e-21	HO189098
Hypothetical protein	<i>Thermobia domestica</i>	8e-04	HO189099
	<i>Plasmodium yoelii yoelii str.</i>		
Hypothetical protein	<i>17XNL</i>	7e-07	HO189100
Unknown	<i>Picea sitchensis</i>	9e-21	HO189101
Unnamed protein product	<i>Haliotis rufescens</i>	8e-06	HO189102
Unknown genes (14 sequences)			HO189103 to HO189116

Table S7. Down-regulated genes identified after 12 hours of 10 µg/l Cu<sup>+2</sup> exposure

Homologue (protein)	Homolog species	BLASTX value	GenBank accession n°
Cytoskeleton			
Collagen pro alpha-chain	<i>Haliotis discus</i>	1e-13	HO189117
Actin	<i>Laodelphax striatellus</i>	2e-07	HO189118
Respiratory chain			
Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Haliotis discus hannai</i>	2e-58	HO189119
Cytochrome c oxidase subunit II	<i>Haliotis iris</i>	4e-29	HO189120
Cytochrome c oxidase subunit III	<i>Haliotis rubra</i>	4e-71	HO189121
ATP synthase	<i>Bombyx mori</i>	4e-19	HO189122
ATP synthase F0 subunit 6	<i>Haliotis rubra</i>	3e-25	HO189123
Ribosomal protein			
Putative ribosomal protein L27	<i>Sipunculus nudus</i>	2e-33	HO189124
Ribosomal protein rpl34	<i>Arenicola marina</i>	5e-17	HO189125
Ribosomal protein rpl8	<i>Eurythoe complanata</i>	9e-63	HO189126
Unknown fonction			
Predicted protein	<i>Nematostella vectensis</i>	1e-29	HO189127
	<i>Staphylococcus epidermidis ATCC 12228</i>	9e-05	HO189128
Hypothetical protein	<i>Parabacteroides distasonis ATCC 8503</i>	9e-06	HO189129
Hypothetical protein BDI_3952	<i>Ruminococcus obeum ATCC 29174</i>	7e-07	HO189130
Hypothetical protein RUMOB_E_04125	<i>Caenorhabditis elegans</i>	9e-15	HO189131
			HO189132
			to
Unknown genes (37 sequences)			HO189168

Table S8. Down-regulated genes identified after 7 days of 10 µg/l Cu<sup>+2</sup> exposure

Homologue (protein)	Homolog species	BLASTX value	GenBank accession n°
Cytoskeleton			
Myosin heavy chain	<i>Haliotis discus hannai</i>	2e-08	HO189169
Protein regulation			
Carboxypeptidase A, putative	<i>Pediculus humanus corporis</i>	2e-22	HO189170
Carboxypeptidase B	<i>Litopenaeus vannamei</i>	8e-22	HO189171
Molting fluid carboxypeptidase A	<i>Bombyx mori</i>	4e-22	HO189172
Raminin receptor	<i>Haliotis discus discus</i>	5e-25	HO189173
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M-like	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	6e-53	HO189174
C. briggsae CBR-ALH-1 protein	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	1e-52	HO189175
Respiratory chain			
Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Haliotis discus hannai</i>	1e-79	HO189176
Cytochrome c oxidase subunit II	<i>Haliotis discus hannai</i>	3e-48	HO189177
Cytochrome c oxidase subunit III	<i>Haliotis tuberculata ssp. AVW-2009</i>	1 <sup>e</sup> -67	HO189178
Xenotibique detoxification			
Peroxisredoxin 6	<i>Haliotis discus discus</i>	8e-48	HO189179
Ribosomal proteins			
Putative 60S ribosomal protein RPL21	<i>Flustra foliacea</i>	4e-16	HO189180
Ribosomal protein rpl3	<i>Lineus viridis</i>	5e-11	
Unknown function			
Hypothetical protein	<i>Branchiostoma floridae</i>	7e-35	HO189181
Predicted protein-like	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	7e-08	HO189182
Unknown genes (53 sequences)			HO189184 to HO189236

## Résumé

Dans les écosystèmes marins côtiers, l'activité anthropique et les paramètres naturels induisent chez les organismes aquatiques des situations de «multistress». Parmi ces paramètres, deux d'entre eux ont été étudiés: La contamination métallique et l'infection bactérienne. Dans ce contexte la compréhension des réponses moléculaires et physiologiques de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens* a été étudiée, en particulier, face l'impact métallique (cuivre), et au pathogène (*Vibrio parahaemolyticus*) en interaction avec des bactéries probiotiques pendant le stade juvénile de ce mollusque en conditions contrôlées. Dans un premier temps, une évaluation sur l'effet d'un consortium probiotique formé de trois souches bactériennes: *Vibrio* sp C21, *Agarivorans albus* F1 et *Vibrio* sp F15 a été testée et les paramètres de survie et de croissance des juvéniles de l'ormeau ont été suivis. Les résultats montrent que les probiotiques augmentent les performances de ces deux paramètres de trait de vie comparés aux individus témoins sans probiotiques. Dans un second temps, une approche génomique par banques soustractives a été réalisée afin d'identifier les transcrits régulés par l'impact métallique. Cette méthode a permis d'identifier 108 gènes potentiellement impliqués dans la réponse cellulaire et physiologique des organismes face au stress. La cinétique de l'expression génique a été suivie à l'aide de 14 transcrits et leur variation temporelle pendant la phase critique révèle des régulations parfois complexes et différentielles chez les organismes. Ensuite, les réponses immunitaires des hémocytes d'ormeau face l'exposition au cuivre ont été recherchées. Les résultats montrent que l'exposition au métal provoque des dysfonctionnements importants des activités hémocytaires. Enfin, l'interaction entre les bactéries pathogènes et probiotiques ont été étudiées et leurs effets sur le mollusque ont été également recherchés. La présence des bactéries pathogènes régule l'expression génique des transcrits impliqués dans des fonctions physiologiques clés des organismes (les défenses immunitaires et l'état énergétique). De plus, les résultats de cette interaction nous renseignent sur le rôle capital accompli par les bactéries probiotiques sur les performances en termes d'amélioration de la survie et de la croissance des jeunes ormeaux en condition de stress.

Mot clés: Ormeau, *Haliotis rufescens*, probiotiques, métaux, cuivre, pathogènes, *Vibrio parahaemolyticus*, immunité, hémocytes.

## Abstract

In coastal ecosystems, anthropogenic activity and natural factors induce “multi-stress” situations. In this study, we focused on two such stress-inducing factors: metal contamination and bacterial infection. Specifically, under controlled conditions, we examined the molecular and physiological responses of red abalone *Haliotis rufescens* toward the impact of a metal (copper) and a pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) with respect to this mollusk's interaction with probiotic bacteria during the juvenile stage. First, we assessed the effect of a consortium of three probiotic bacterial strains—*Vibrio* sp. C21, *Agarivorans albus* F1, and *Vibrio* sp. F15—on two abalone lifecycle-related parameters, namely, survival and growth. The results showed that, compared to the control treatment (no probiotics), the probiotics improved the performance of these two lifecycle parameters. In a second step, the molecular mechanisms underlying the juvenile abalone response to copper stress were studied under experimental conditions, using a suppression subtractive hybridization method. This method identified 108 partial sequences of genes involved in the cellular and physiological responses to stress. The kinetics of gene expression were followed using 14 of these transcripts, and their temporal variations during the critical phase showed complex and differential regulation exerted by copper in these organisms. We then investigated the immune response of abalone hemocytes to copper exposure. The results showed that exposure to the metal causes a significant dysfunction of hemocyte activities. Finally, the interaction between probiotics and pathogenic bacteria (transcriptomic and cellular aspects) was studied and the effects of these bacteria on mollusk performance were also investigated. The presence of pathogenic bacteria was found to regulate gene expression of transcripts involved in key physiological functions, including those that regulate immune responses and energy metabolism. Examination of these interactions thus indicates the role of probiotic bacteria in performance in terms of the improved survival and growth of juvenile abalone under stress conditions.